

Université de Montréal

**Établissement et persistance du réservoir du VIH chez des
individus traités très tôt en phase aigüe de l'infection
(cohorte RV254)**

par Louise Leyre

Département de Microbiologie, Infectiologie et Immunologie
Faculté de Médecine

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

29 Août 2018

© Louise Leyre, 2018

Résumé

Mots-clés : Réservoir du VIH, infection aigüe, traitement précoce, tissus lymphoïdes, cellules T CD4⁺ mémoires

Les thérapies antirétrovirales (TAR) ont grandement amélioré la qualité de vie des personnes infectées par le VIH qui y ont accès. Cependant, ces thérapies ne permettent pas d'éradiquer le virus qui persiste sous forme latente au sein des cellules T CD4⁺ de longue vie, formant ainsi un réservoir viral qui représente un des obstacles majeurs vers la guérison du VIH.

De nombreuses études ont montré que l'initiation de TAR en phase aigüe permet de retarder le rebond viral voire même dans certains cas de contrôler la virémie du virus suite à une interruption de traitement. Néanmoins, le moment et la localisation de l'établissement du réservoir du VIH pendant l'infection aigüe restent incertains.

En utilisant des échantillons de sang et de tissus lymphoïdes de participants en phase aigüe d'infection, nous montrons que le virus s'intègre en premier lieu dans les cellules des ganglions lymphatiques et du colon et atteint des fréquences maximales de cellules infectées dès le stade Fiebig II, soit avant la séroconversion. De plus, nous observons que l'initiation précoce de TAR diminue drastiquement le nombre de cellules infectées et ce dans tous les compartiments. Toutefois quelques cellules infectées persistent dans les ganglions lymphatiques. Nos résultats suggèrent qu'un grand nombre de cellules sont infectées très tôt au cours de l'infection aigüe mais elles forment un réservoir instable qui est rapidement éliminé suite à l'initiation précoce de TAR.

Abstract

Keywords : HIV reservoir, acute infection, early treatment, lymphoid tissues, memory CD4⁺ T cells

Antiretroviral therapies (ART) have largely increased the life expectancy of the HIV infected individuals who have access to it. Nonetheless, these therapies can't eradicate the virus that persist in a latent state in long-lived CD4⁺ T cells. These infected cells form a viral reservoir that remains the main obstacle to a cure.

Several studies have shown that initiation of ART during the acute infection can lead to a delay in the viral rebound or in some cases to viremia control after a treatment interruption. However, the timing and location of the establishment and persistence of the viral reservoir during acute infection remain unclear.

Using, blood and lymphoid tissues samples from acutely infected participants, we observed that the virus is firstly integrated in lymph nodes and colon cells and reaches a maximum frequency of infected cells at the Fiebig stage II, i.e. before seroconversion in the tissues. Moreover, we saw that a very early initiation of ART results in a drastic decrease of the number of infected cells in all compartments. Nonetheless a few infected cells persist under ART in the lymph nodes.

Our results suggest that a large number of cells are infected early in tissues before moving into the blood during the acute infection. Nonetheless, these infected cells form a labile HIV reservoir which is rapidly, but incompletely, eliminated by an early initiation of ART.

Table des matières

Résumé	i
Abstract	ii
Table des matières	iii
Liste des tableaux	vii
Liste des figures	viii
Liste des sigles	xi
Remerciements	xiii
Chapitre 1 : Introduction	1
1.1 Virus de l'immunodéficience humaine : le VIH	2
1.1.1 Histoire du VIH	2
1.1.2 Origine et diversité génétique du VIH	3
1.1.3 Modes de transmission	4
1.2 Pathogénèse du VIH	5
1.2.1 Génome du VIH	5
1.2.2 Structure du VIH	6
1.2.3 Cycle de réplication du VIH	7
1.2.4 Pathologie du VIH	10
1.3 Les traitements antirétroviraux : d'une pandémie à une maladie chronique	14
1.3.1 La révolution des antirétroviraux	14
1.3.2 Différentes catégories d'antirétroviraux	16
1.3.3 Les limitations des antirétroviraux	19
1.4 Réservoirs du VIH	19
1.4.1 La compartimentation du réservoir du VIH	20
1.4.2 La maintenance du VIH	23
1.4.3 Quantification des réservoirs du VIH	25
1.5 Vers une rémission du VIH	27

1.5.1 Guérison complète N=1	28
1.5.2 Initiation précoce de TAR amène à un rebond viral retardé post-interruption	28
1.5.3 Initiation précoce de TAR amène à un contrôle de la virémie post-interruption.....	29
1.6 Rationnel et hypothèses.....	29
Chapitre 2 : Méthodologie.....	32
2.1 Les cohortes.....	33
2.1.1 Cohorte d'individus en phase aigüe	33
2.1.2 Cohortes contrôles de personnes en phase chronique	34
2.2 Mesures virologiques	35
2.3 Préparation et conservation des échantillons	35
2.3.1 Isolation des cellules mononucléaires du sang (PBMCs)	35
2.3.2 Isolation des cellules mononucléaires du ganglions lymphatiques (LNMCs).....	36
2.3.3 Biopsies de colon	36
2.4 Quantification des réservoirs du VIH.....	36
2.4.1 Mesure de l'ADN total et intégré du VIH ainsi que des cercles 2-LTR	36
2.4.2 TILDA « Essai de dilution limite de l'ARN tat/rev induit ».....	40
2.4.3 HIV Flow.....	44
2.4.4 Estimation du réservoir total du VIH dans le corps	45
2.5 Cytométrie en flux.....	46
2.5.1 Caractérisation Immunologique	46
2.5.2 Tri cellulaire	47
2.6 Statistiques	48
Chapitre 3 : Résultats	49
3.1 Description de la Cohorte.....	50
3.2 Établissement du réservoir du VIH pendant la phase aigüe d'infection	51
3.2.1 Dynamique de l'établissement du réservoir du VIH dans le sang	52
3.2.2 Établissement du réservoir du VIH dans les ganglions lymphatiques et le colon comparé au sang.....	56

.....	57
3.3 Impact de l'initiation de TAR en phase aigüe sur la taille du réservoir du VIH.....	60
3.3.1 Dynamique du réservoir du VIH dans le sang après initiation du traitement en phase aigüe	60
3.3.2 Réservoir du VIH après six mois à deux ans de traitement dans les tissus comparés au sang.....	63
.....	65
3.3.3 Décroissance du réservoir du VIH selon le compartiment et le moment où TAR est initiée.....	67
.....	68
.....	70
3.4 Répartition du réservoir du VIH dans les sous-populations des cellules T CD4 ⁺ dans le sang.....	70
3.4.1 Établissement du réservoir du VIH dans les différentes sous-populations des cellules T CD4 ⁺ pendant la phase aigüe d'infection dans le sang	71
3.4.2 Impact de l'initiation de TAR en phase aigüe sur la persistance du VIH au sein des sous-populations des cellules T CD4 ⁺	75
Chapitre 4 : Discussion	80
4.1 Établissement précoce du réservoir du VIH durant la phase aigüe de l'infection	81
4.1.1 Les mesures de l'ARN et de l'ADN viral montrent une intégration précoce du virus	81
4.1.2 L'activation des cellules T facilite l'établissement du réservoir du VIH.....	82
4.1.3 Les réservoirs du VIH s'établissent en premier lieu au sein des tissus lymphoïdes	83
4.2 L'initiation précoce de TAR en phase aigüe de l'infection influence la taille du réservoir du VIH.....	84
4.2.1 Décroissance du réservoir du VIH lorsque TAR est initiée en phase aigüe	85
4.2.2 Les cellules infectées persistant sous TAR sont préférentiellement localisées dans les tissus lymphoïdes	87
4.3 Établissement et persistance du VIH en phase aigüe dans les sous-populations des cellules T CD4 ⁺ du sang	87

4.4 Un traitement très précoce est-il suffisant pour contrôler le virus ?	89
4.5 Limitation statistique.....	91
Chapitre 5 : Conclusion.....	92
Bibliographie.....	96
Affiche CROI 2017	i
Affiche IAS 2017	ii

Liste des tableaux

Tableau I.	Tests pour la classification Fiebig	34
Tableau II.	Séquences des amorces de pré-amplification pour les PCR de l'ADN viral 38	
Tableau III.	Conditions des pré-amplification pour les PCR de l'ADN viral.....	38
Tableau IV.	Séquences des amorces d'amplification pour les post-PCR de l'ADN viral 39	
Tableau V.	Conditions d'amplification en temps réel des PCR de l'ADN viral	39
Tableau VI.	Amorces et sonde tat/rev pour le TILDA du clade AE	42
Tableau VII.	Conditions de rétrotranscription et d'amplification de l'ARN épissé....	42
Tableau VIII.	Condition d'amplification en temps réel de l'ARN épissé tat/rev	43
Tableau IX.	Données cliniques des participants des cohortes RV254 et RV304	50

Liste des figures

Figure 1.	Distribution mondiale des différents clades et recombinaisons du VIH-1	4
Figure 2.	Organisation du génome du VIH-1.....	6
Figure 3.	Schéma de la structure du VIH-1	7
Figure 4.	Schéma du cycle de réplication du VIH	9
Figure 5.	Pathologie de l'infection du VIH.....	10
Figure 6.	Classification Fiebig de la phase aiguë du VIH	12
Figure 7.	Chronologie des antirétroviraux contre le VIH de 1986 à 2013	15
Figure 8.	Évolution de l'espérance de vie des personnes vivants avec le VIH de 1995 à 2010	16
Figure 9.	Caractéristique des sous-populations des cellules T CD4 ⁺	22
Figure 10.	Persistance du réservoir du VIH.....	25
Figure 11.	Les différents essais pour quantifier le réservoir du VIH	26
Figure 12.	Cas de contrôle du virus post interruption d'un traitement initiée en phase aiguë	27
Figure 13.	Schéma TILDA	44
Figure 14.	Données cliniques selon le stade Fiebig avant l'initiation de TAR	51
Figure 15.	Mesures de l'ADN et de l'ARN viral avant l'initiation de TAR selon le stade de l'infection	53
Figure 16.	Médianes des différentes mesures de l'ADN et l'ARN viral selon le stade de l'infection	54
Figure 17.	Marqueurs d'activation et de prolifération selon le stade de l'infection avant l'initiation de TAR	56
Figure 18.	Mesures de l'ADN intégré du VIH dans les ganglions lymphatiques, les biopsies de colon et le sang selon le moment de l'infection avant l'initiation de TAR.....	57
Figure 19.	Pourcentage des échantillons avec de l'ADN intégré du virus détectables selon le compartiment avant l'initiation de TAR.....	58
Figure 20.	Corrélation entre les mesures d'ADN intégré du VIH dans les ganglions lymphatiques (A) et les biopsies de colon (B) avec la charge virale avant initiation de TAR	59

Figure 21.	Ratio de l'ADN total et de l'ADN intégré du VIH dans les ganglions lymphatiques, les biopsies du colon et le sang pendant la phase aiguë de l'infection	59
Figure 22.	Mesures longitudinales de l'ADN viral sur 96 semaines de TAR dans le sang	61
Figure 23.	Fréquences des PBMCs avec de l'ADN viral dans le sang après 96 semaines de traitement	62
Figure 24.	Comparaison des différentes mesures de l'ADN viral entre les personnes traitées en phase aiguë et les personnes traitées en phase chronique dans le sang	63
Figure 25.	Mesures de l'ADN intégré du VIH dans les ganglions lymphatiques, les biopsies de colon et le sang après 24 à 96 semaines de traitement.....	64
Figure 26.	Mesures de l'ADN intégré du VIH dans les ganglions lymphatiques, les biopsies de colon et le sang selon le stade Fiebig où le traitement est initié, après 24 à 96 semaines de traitement.....	65
Figure 27.	Estimation du nombre total de cellules T CD4⁺ infectées dans tout le corps selon le stade d'infection	67
Figure 28.	Comparaison des fréquences des cellules avec de l'ADN intégré du VIH avant et sous TAR dans les tissus et le sang, selon le stade Fiebig.....	68
Figure 29.	Médianes de la décroissance des cellules contenant de l'ADN intégré du VIH dans le sang, les biopsies du colon et les ganglions lymphatiques selon le moment où TAR est initiée	69
Figure 30.	Comparaison entre les fréquences des cellules produisant de l'ARN épissé tat/rev après stimulation avant et sous traitement.....	70
Figure 31.	Fréquences des cellules T CD4⁺ portant de l'ADN intégré du VIH dans les différentes sous-populations T CD4⁺ selon le stade de l'infection	72
Figure 32.	Contribution des cellules avec de l'ADN intégré du VIH pour chaque sous-population T CD4⁺ avant l'initiation du traitement	73
Figure 33.	Stratégie de délimitation pour le HIV flow ex vivo	74
Figure 34.	Contribution des cellules produisant de la p24 en phase aiguë de l'infection dans le sang	75

Figure 35. Mesures de l'ADN intégré du VIH dans les différentes sous-populations des cellules T CD4⁺ selon le stade de l'infection en comparant avant et après 24 à 96 semaines de TAR	76
Figure 36. Médianes de la décroissance des cellules contenant de l'ADN intégré du VIH dans les différentes sous-populations des cellules T CD4⁺ selon le moment où TAR est initiée	77
Figure 37. Fréquences des cellules Naïves, T_{CM}, T_{TM}, T_{EM} CD4⁺ contenant de l'ADN viral intégré sous TAR comparant les participants traités en phase aiguë aux participants traités en phase chronique.....	78
Figure 38. Contribution des cellules avec de l'ADN intégré du VIH pour chaque sous-population T CD4⁺ après 24 à 96 semaines de TAR	79

Liste des sigles

ADCC : Cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps

ADN : Acide désoxyribonucléique

ARN : Acide ribonucléique

cTAR : Combinaison de thérapie antirétrovirale

CDC : Center for disease control

CTL : Lymphocytes T cytotoxique

DMSO : Dimethyl sulfoxide

EFV : Efavirenz

ELISA : Méthode immuno-enzymatique

FBS : Fetal Bovine Serum

FTC : Emtricitabine

GALT : Organes lymphoïdes de l'intestin

HTLV : Virus T-lymphotropique humain

INNTI : Inhibiteur non-nucléotidique dépendant

INTI : Inhibiteur nucléotidique de la transcription inverse

IP : Inhibiteur de protéase

LNMC : Cellules mononucléaires des ganglions lymphatiques

LTR : Longues répétitions terminales

MVR : Maraviroc

PBMC : Cellules mononucléaires du sang en périphérie

PBS : Phosphate-buffered saline

PCR : Amplification en chaîne par polymérase

PIC : Complexe d'intégrase

PJP : Pneumocystis jiroveci pneumonia

PK : Protéinase K

PNH : primate non-humain

QVOA : Quantitative viral outgrowth assay

QPCR : PCR quantitative

RAL : Raltegravir

RPMI : Roswell Park Memorial Institute medium
RT : Transcription inverse
SIDA : Syndrome d'immunodéficience acquise
TAR : Thérapie antirétrovirale
TB : Tuberculose
T_{CM} : Cellule T CD4⁺ centrale mémoire
TDF : Tenofovir
T_{EM} : Cellule T CD4⁺ effectrice mémoire
TILDA : Essai de dilution limite de l'ARN tat/rev induit
T_{SCM} : « Cellules souches » T CD4⁺ mémoires
T_{TM} : Cellule T CD4⁺ transitionnelle mémoire
VIH : Virus immunodéficience humain
VIS : Virus immunodéficience simienne

Remerciements

Au terme de ma maîtrise, j'aimerais avant tout remercier mon directeur de recherche, le Dr. Nicolas Chomont pour m'avoir guidé et donné le goût de la recherche. Je le remercie également pour m'avoir donné cette opportunité unique de pouvoir travailler sur un projet aussi captivant.

Je voudrais aussi remercier Marta Massanella Luna, Post-doctorante et Rémi Fromentin, associé de recherche, pour leur soutien, leurs conseils et d'avoir pris le temps de m'initier à de nombreuses techniques. Je remercie également Amélie Pagliuzza pour son aide technique. Finalement toute ma reconnaissance aux différents membres du laboratoire qui ont fait de ces années de maîtrise un apprentissage sans fin dans une ambiance très agréable.

Je remercie aussi tous nos collaborateurs : l'équipe SEARCH de Thaïlande et la chef de projet Jintanat Ananworanich qui ont fait un merveilleux travail en coordonnant le projet et en recrutant les participants. Je souhaiterais aussi remercier tous les participants des cohortes RV254, RV304 et SEARCH11 sans qui ce projet n'existerait pas.

Enfin, je tiens à remercier mon conjoint et mes parents pour leur soutien en tout temps malgré la distance.

Chapitre 1 : Introduction

1.1 Virus de l'immunodéficience humaine : le VIH

Le Virus de l'immunodéficience humaine, connu sous son acronyme VIH, est à l'origine de la dernière pandémie mondiale du 20^{ème} siècle, amenant à la mort de plus de 35 millions de personnes. À ce jour, l'épidémie est encore loin d'être terminée car plus de 36,7 millions de personnes vivent avec VIH et 1,8 millions d'individus ont été nouvellement diagnostiqués en 2016 (UNAIDS, 2017).

1.1.1 Histoire du VIH

La première personne infectée, dont le sang a été testé à posteriori, remonte à 1920 à Kinshasa en République démocratique du Congo (Faria et al., 2014). Cependant, l'épidémie débute réellement dans les années 80. En 1981, plusieurs cas de sarcomes de Kaposi et de pneumonies à *Pneumocystis Jirovecii* (anciennement *Pneumocystis Carinii*, PJP) inhabituels chez des jeunes hommes ayant des relations avec d'autres hommes sont reportés aux États-Unis. Sur huit patients identifiés à New-York, quatre décèdent dans les vingt premiers mois après le diagnostic sans aucun effet de la chimiothérapie (Hymes et al., 1981). De même en Californie, sur dix-neuf patients identifiés huit décèdent dans les quelques mois suivant leur diagnostics (CDC, 1981). Le facteur commun identifié chez tous ces patients, est un état général d'immunodépression (Centre for Disease Control CDC, 1982). En Septembre 1982, le centre de contrôle des maladies (CDC) mentionne pour la première fois le syndrome d'immunodéficiences acquise (SIDA) (Centers for Disease Control CDC, 1982). En parallèle, les cas se multiplient sans que l'on connaisse l'agent étiologique de cette immunodépression. Cela ne concerne plus uniquement les

hommes ayant des relations avec d'autres hommes puisque les personnes hémophiles, les usagers des drogues intraveineuses, les femmes et hommes hétérosexuels sont également atteints (CDC, 1983; Masur et al., 1981). Dans le courant de l'année 1982, l'épidémie mondiale est déclarée et des cas sont recensés en Europe, en Afrique et en Asie. Finalement en 1983, la cause du SIDA est identifiée par l'équipe de Luc Montagnier et Françoise Barré-Sinoussi à l'Institut Pasteur (Barre-Sinoussi et al., 1983). Il s'agit d'un virus à ARN qui sera d'abord associé aux virus T-lymphotropique humain (HTLV) mais n'amenant pas toujours à un diagnostic de cancer, il sera par la suite renommé virus de l'immunodéficience humaine (VIH) (Coffin et al., 1986).

1.1.2 Origine et diversité génétique du VIH

Le VIH est un lentivirus qui émane de cross-transmissions avec le virus de l'immunodéficience simienne (VIS) trouvé chez les singes (Sharp & Hahn, 2011). Plusieurs transmissions ont eu lieu entre l'homme et le singe donnant différents types de VIH : les groupes M, N sont originaires du VIS du chimpanzé *Pan troglodytes troglodytes* d'Afrique du centre-ouest alors que les groupes O et P proviennent du Gorille. Cependant, le groupe M est le plus vieux lignage chez l'humain et est prédominant. Le VIH évoluant très rapidement à cause de la transcription inverse de son ARN, un mécanisme qui n'a pas de système de correction des mutations, le groupe M s'est rapidement diversifié donnant différents sous types et recombinaisons. Les clades les plus présents sont le clade A en Asie, le clade B en Amérique et en Europe, les clades C et D en Afrique (J. Hemelaar, 2012). Certains clades ou recombinaisons entre clades sont concentrés dans des régions spécifiques tel que le clade CRF01_AE en Asie du Sud/Est, notamment en Thaïlande où les cohortes de notre projet sont localisées (figure 1).

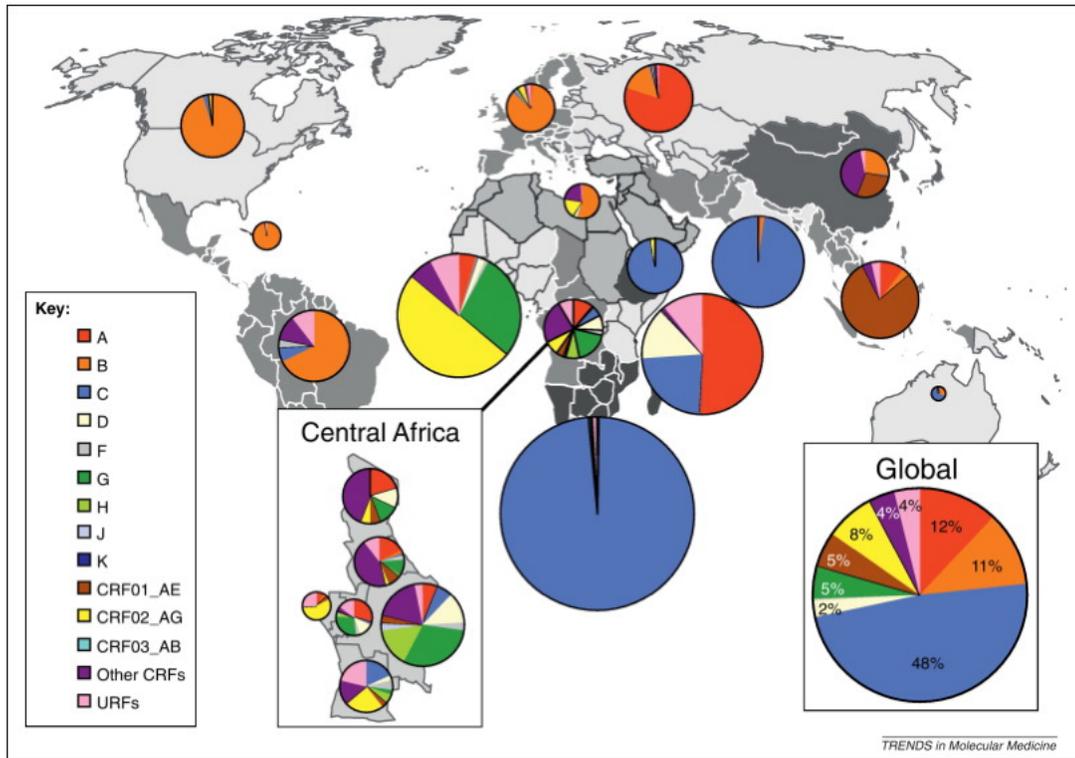


Figure 1. Distribution mondiale des différents clades et recombinants du VIH-1

Les diagrammes circulaires représentent la distribution des différents clades et recombinants du HIV-1 pour chaque région entre 2004 et 2007. La surface de chaque diagramme correspond aux nombres relatifs de personnes vivant avec le VIH dans la région. Chaque couleur représente, selon la légende en bas à gauche, un sous-type ou recombinants du VIH-1. Le diagramme en bas à droite résume la proportion mondiale des clades principaux du VIH-1. Source(Joris Hemelaar, 2011; J. Hemelaar, 2012)

1.1.3 Modes de transmission

Le VIH est retrouvé en grande quantité dans le sang, le sperme, les sécrétions vaginales et le lait maternel (CDC, 2018; UNAIDS, 1998). Ainsi, le virus peut être transmis de façon horizontale lors de rapports sexuels non protégés, lors du partage de seringue chez les usagers de drogues ou encore lors de transfusion sanguine. Le virus peut aussi être transmis verticalement d'une

mère à son enfant est cela peut arriver *in-utero*, *intrapartum* soit lors de l'accouchement ou par l'allaitement (Blanche et al., 1989; De Cock et al., 2000). Aujourd'hui, les lignes directives de préventions contre la transmission du VIH ont permis de réduire la transmission du VIH de la mère à l'enfant et la transmission entre usagers de drogues. La majorité des nouvelles infections sont à ce jour dues à des rapports sexuels non-protégés (CDC, 2018).

1.2 Pathogénèse du VIH

Le VIH est un lentivirus qui fait partie de la famille de *retroviridae*. Il s'agit donc d'un virus enveloppé à ARN simple brin qui a pour caractéristique première de posséder sa propre transcriptase inverse permettant la rétro transcription de son ARN en ADN afin de s'intégrer dans le génome de la cellule hôte (Ryu, 2017).

1.2.1 Génome du VIH

Le génome du VIH de 9,8 Kilobase code pour 16 protéines virales essentielles pour la formation et la réplication de nouveaux virions. À chaque extrémité, du génome se trouve les longues répétitions terminales (LTR) et le LTR en 5' code notamment pour le promoteur de la transcription de gènes viraux. À la suite, viennent les trois gènes principaux : *gag* (groupe antigènes spécifiques), *pol* (polymérase) et *env* (enveloppe) qui codent respectivement pour les protéines structurales, les enzymes virales et les protéines de l'enveloppe. Le reste du génome code pour les protéines régulatrices de la transcription Tat et Rev et pour les protéines accessoires tel que Nef, Vpr, Vif et Vpu essentielles à la réplication virale.(Li & De Clercq,

2016; Marcus Altfeld, 2015; Seitz, 2016; Stein, Storcksdieck Genannt Bonsmann, & Streeck, 2016) (figure 2).

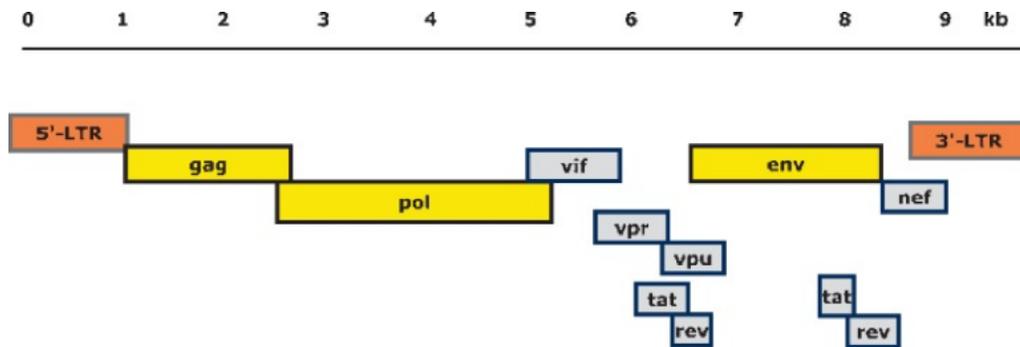


Figure 2. Organisation du génome du VIH-1

Les cadres de lecture des gènes codants pour les protéines structurales et régulatrices sont représentés. LTR : longues terminaisons répétées, gag = groupe antigène spécifique, pol = polymérase, env = l'enveloppe. Tat et rev sont les gènes donnant les protéines régulatrices de la transcription. Les gènes vif, vpr, nef et vpu codent pour les protéines accessoires. Le génome du VIH-1 fait entre 9200 et 96000 nucléotides (dessin de Lutz Gürtler). Source (Seitz, 2016)

1.2.2 Structure du VIH

Le VIH forme une particule ronde entre 120-150 nm de diamètre. Soixante-douze complexes glycoprotéiques sont intégrés à la membrane lipidique et chaque complexe est constitué des trois glycoprotéines 120 (Gp120) extracellulaires et de trois glycoprotéines 41 (Gp41) transmembranaires. Les Gp120 interagissent avec les Gp41 et adopte une conformation ouverte afin de se lier au récepteur CD4 des lymphocytes T (Pancera et al., 2010). À l'intérieur du virion se trouve d'autres protéines structurales tel que la protéine 17 (p17) constituant la matrice, la protéine 24 (p24) formant la capsid et la protéine 7 (p7) constituant la nucléocapsid. Dans la capsid se trouve les deux simples brins positifs d'ARN ainsi que les complexes enzymatiques essentiels à la réplication : la transcriptase inverse (p66/p51) qui comme expliqué plus haut permet la rétro-transcription de l'ARN en ADN, l'intégrase (p31) qui assiste l'intégration de

l'ADN viral dans le génome de la cellule hôte et la protéase qui clive les poly-protéines synthétisées pour générer les protéines matures. Finalement, au sein de la capsid se trouve aussi des protéines accessoires tel que Nef (facteur de régulation négatif), Vif (facteur d'infection virale), Vpr (protéine virale r) et Vpu (protéine virale unique) qui sont essentielles pour la pathogénicité et la réplication du virion au sein de la cellule hôte (Li & De Clercq, 2016; Seitz, 2016) (figure 3).

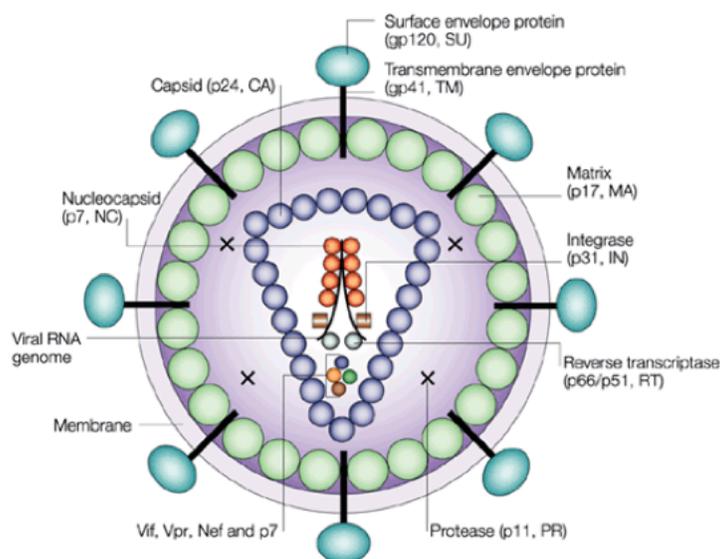


Figure 3. Schéma de la structure du VIH-1

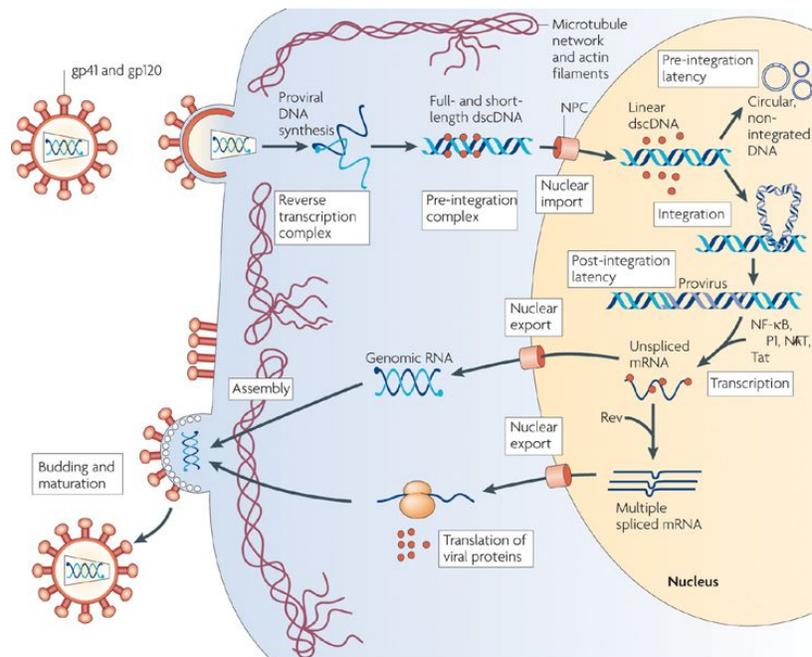
Schéma montrant les glycoprotéines de l'enveloppe (Gp120 et Gp41), les protéines structurantes telles que la capsid (p24) et la matrice (p17) et les enzymes virales soit : l'intégrase, la transcriptase inverse et la protéase. Les protéines accessoires sont aussi illustrées (Vif,Vpr,Nef et p7). Source (Robinson, 2002)

1.2.3 Cycle de réplication du VIH

Le cycle de réplication du VIH peut être divisé en deux phases. Lors de la phase précoce, la Gp120 du virus se lie au récepteur CD4⁺ exprimé par plus de 60% des lymphocytes T et par de nombreuses cellules du système immunitaire tel que les cellules dendritiques et les macrophages. Néanmoins, cette liaison n'est pas assez forte pour permettre la fusion. Dans un

deuxième temps, la Gp120 se lie aux récepteurs à chimiokines CCR5 ou moins fréquemment à CXCR4 dépendamment du tropisme du virus. La double liaison permet une ouverture de Gp120 et un changement de conformation de Gp41 rapprochant la membrane lipidique virale de la membrane lipidique cellulaire amenant à leur fusion (Engelman & Cherepanov, 2012). À la suite de la fusion, la capsid virale est relarguée dans le cytoplasme de la cellule hôte et la transcriptase inverse initie la transcription inverse du simple brin d'ARN en ADN proviral double brin. Cet ADN proviral est ensuite exporté au noyau cellulaire à travers les pores nucléaires à l'aide du complexe de pré-intégration (PIC) formé par l'intégrase et d'autres entités virales (figure 4). Finalement, l'intégrase induit l'intégration de l'ADN proviral dans le génome de la cellule hôte, préférentiellement dans une région où la transcription est active et le génome ouvert (Li & De Clercq, 2016). Toutefois, l'ADN viral n'est pas toujours intégré dans le génome de la cellule hôte. Il peut persister dans le noyau sous forme linéaire ou sous forme circulaire. En effet, au sein de noyau de la cellule, des cercles 1-LTR et 2-LTR peuvent être formés à la suite d'une recombinaison ou par le mécanisme de réparation de l'ADN de la cellule hôte qui joint les deux extrémités du ADNc viral (Sloan & Wainberg, 2011; Y. Wu, 2004).

À la suite de l'intégration, le génome viral peut demeurer dans un état latent au sein de la cellule hôte ou peut être transcrit, selon le niveau d'activation de la cellule hôte. La transcription de l'ADN viral marque le début de la phase tardive du cycle cellulaire. Cette transcription amène à la synthèse des différentes protéines virales décrites ci-dessus, ainsi qu'à la production de deux brins d'ARN viral complets. Les différents composants du virion sont par la suite empaquetés dans l'enveloppe formée de la membrane lipidique de la cellule hôte où les protéines Gp120 et Gp41 virales sont intégrées. L'enveloppe provenant de la membrane lipidique de la cellule hôte, elle peut contenir des récepteurs spécifiques de la cellule hôte. Finalement, les virions finissent par bourgeonner et se détachent de la membrane pour aller infecter d'autres cellules (Freed, 2015) (figure 4).



Nature Reviews | Microbiology

Figure 4. Schéma du cycle de réplication du VIH

Ce schéma illustre la phase précoce avec l'entrée virale, la rétro-transcription et l'intégration ou la formation de cercles LTR et la phase tardive avec la transcription et production de nouveaux virions. Source (Coiras, López-Huertas, Pérez-Olmeda, & Alcamí, 2009)

1.2.4 Pathologie du VIH

Le VIH provoque une infection chronique qui conduit à la perte des fonctions immunitaires. Ceci est dû aux propriétés infectieuses du virus et à la réponse immunitaire de l'hôte (Fanales-Belasio, Raimondo, Suligoi, & Butto, 2010). En effet, le VIH infecte les cellules présentant le récepteur CD4⁺ soit, principalement les lymphocytes T mais aussi les cellules dendritiques et les macrophages (Simon, Ho, & Abdool Karim, 2006). En déplaçant les lymphocytes T CD4⁺, le VIH induit une forte immunodéficience (De Boer, 2007). La pathogénèse du VIH est segmentée en trois étapes qui sont plus ou moins longues selon les personnes infectées : la phase aiguë dure entre six et douze semaines, la phase chronique de quelques mois à des années et finalement le stade SIDA (Fauci, Pantaleo, Stanley, & Weissman, 1996)(figure 5).

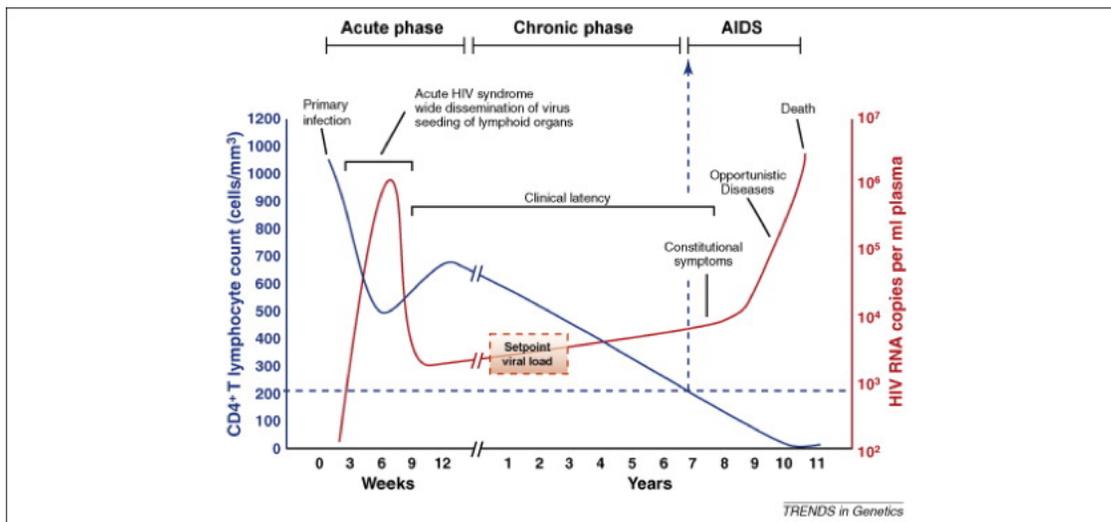


Figure 5. Pathologie de l'infection du VIH

Schéma des trois phases de l'infection du VIH montrant l'évolution de la charge virale et du compte CD4⁺. Source (An & Winkler, 2010)

- Phase aigüe :

La phase aigüe de l'infection est elle-même composée de différents stades hiérarchisés selon la classification Fiebig établie en 2003 (Fiebig et al., 2003)(figure 6). Les premiers 10 jours après la transmission, le virus n'est cliniquement pas détectable, c'est la phase éclipse. Cependant, le VIH se réplique localement à bas bruit dans les muqueuses, les organes lymphoïdes de l'intestin (GALT) et les tissus lymphatiques (Shaw & Hunter, 2012). Le stade Fiebig I commence avec la détection de l'ARN viral qui devient quantifiable à partir de 5-10 copies par mL de plasma. En parallèle, aucune protéine virale n'est détectable à ce stade (Palmer et al., 2003). Après 15 jours d'infection, la protéine virale de l'enveloppe p24 est à son tour identifiable dans le sang. À ce moment, le virus se réplique très rapidement sans que la réponse immunitaire innée puisse le contrôler (McMichael, Borrow, Tomaras, Goonetilleke, & Haynes, 2010; Shaw & Hunter, 2012). Au cours du stade Fiebig III, les premiers anticorps IgM spécifiques au VIH sont détectés par ELISA (Fiebig et al., 2003). Malgré la mise en place d'une réponse immunitaire adaptative, la charge virale dans le sang continue d'augmenter à plus de 1 millions de copies d'ARN par mL. Dès les premiers jours après l'infection jusqu'au pic viral, le virus se transmet efficacement aux nombreux lymphocytes T CD4⁺ des organes lymphoïdes grâce aux cellules dendritiques plasmacytoïdes. Ces cellules dendritiques se trouvent dans les muqueuses souvent le lieu primaire de l'infection et elles peuvent d'être infectées par le virus. Par la suite afin d'initier une réponse adaptative, elles migrent vers les organes lymphoïdes et transmettent le virus efficacement par contact cellulaire avec les cellules T CD4⁺ présentes en grand nombre dans ces compartiments (McMichael et al., 2010; Shaw & Hunter, 2012). Ce mécanisme entraîne une déplétion des cellules T CD4⁺ dans l'intestin (Guadalupe et al., 2003; Mehandru et al., 2004) et à partir du pic viral soit le stade Fiebig III, la déplétion des cellules T CD4⁺ est aussi notable

dans le sang. Durant ce premier mois d'infection, un grand nombre de personnes infectées expriment des symptômes divers et variés pouvant aller des symptômes cliniques de la grippe à des « rash cutanés » (Fanales-Belasio et al., 2010; Moir, Chun, & Fauci, 2011). Finalement, au stade Fiebig IV/V soit 4 à 12 semaines après l'infection, la réponse immunitaire adaptative s'intensifie et les anticorps spécifiques du VIH sont quantifiables par immunobuvardage de type Western. La charge virale dans le plasma décroît progressivement et atteint un point stable (Moir et al., 2011; Shaw & Hunter, 2012). (figure 6)

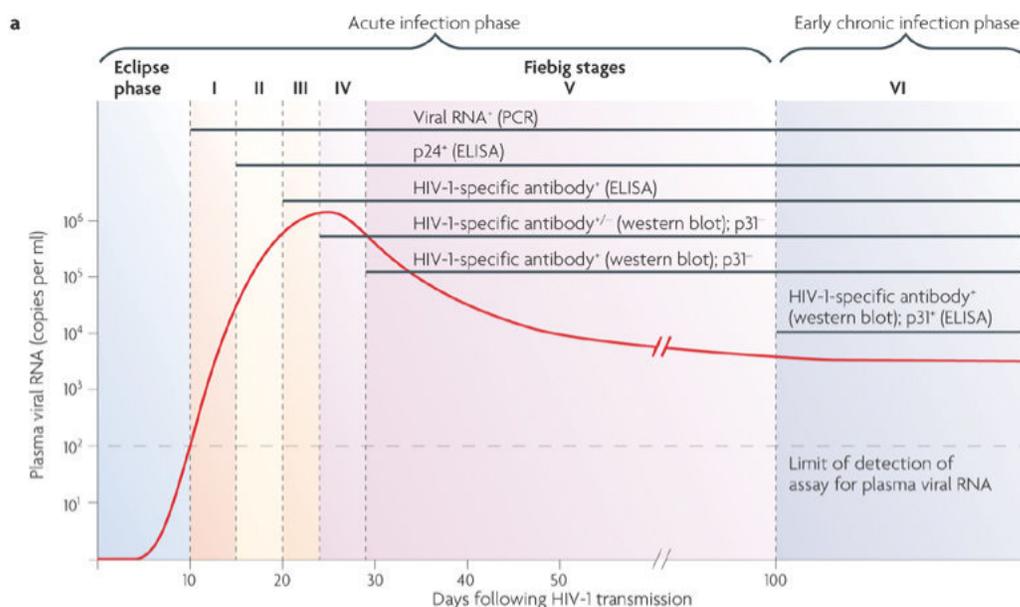


Figure 6. Classification Fiebig de la phase aigüe du VIH

Schéma représentant la charge virale et la positivité des tests pour chaque stade Fiebig Source (An & Winkler, 2010; McMichael et al., 2010)

- Phase chronique :

La phase chronique du VIH aussi appelé la phase asymptomatique ou la latence clinique est le stade le plus long de l'infection. Elle commence plus ou moins après deux à trois mois

d'infection et peut durer des années (An & Winkler, 2010). La mise en place d'une réponse immunitaire de types cellulaire et humorale contrôle partiellement la réplication et stabilise la virémie du virus. Notamment, les anticorps neutralisants se lient aux virions et limitent l'infection de nouvelles cellules. Ces anticorps spécifiques permettent l'identification et l'élimination des cellules infectées par cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps (ADCC) effectué par les cellules tueuses naturelles (NK) (Fanales-Belasio et al., 2010; Letvin & Walker, 2003). De plus, des lymphocytes T CD8⁺ cytotoxiques (CTL) spécifiques pour le virus arrivent à identifier les cellules infectées et à les éliminer en produisant des granzymes, de la perforine ou le ligand Fas induisant l'apoptose de ces cellules (Marsden & Zack, 2015; Wei et al., 2003). Néanmoins, le VIH échappe au système immunitaire en se diversifiant très rapidement par mutation. En parallèle, le système immunitaire en hyper activation constante commence à s'épuiser (Maartens, Celum, & Lewin, 2014). Ainsi, le VIH continue de se répliquer et le compte des lymphocytes T CD4⁺ décroît graduellement.

- Stade SIDA :

En dessous de 200 lymphocytes T CD4⁺ par μ L de sang, le risque d'infections opportunistes par des bactéries, des virus, des champignons ou des parasites devient très grand et la vie de la personne infectée est menacée. À ce stade, les ganglions lymphatiques sont enflés, les patients ont de la fièvre et développent des problèmes respiratoires (Fanales-Belasio et al., 2010). Finalement, les personnes infectées finissent par mourir d'infections opportunistes, la plus commune aujourd'hui étant la tuberculose (TB) avec 400 000 personnes infectées décédées de la TB en 2017 (WHO, 2017).

1.3 Les traitements antirétroviraux : d'une pandémie à une maladie chronique

1.3.1 La révolution des antirétroviraux

L'introduction d'une thérapie antirétrovirale (TAR) contre le VIH a complètement changé l'issue de cette infection. Ce qui était dans les années 80 une des plus hautes causes de mortalité devient dans les années 90-2000 une maladie chronique contrôlable pour les personnes qui ont accès aux traitements. En effet, l'identification du VIH et de son cycle viral a permis le développement de traitements bloquant les étapes critiques du cycle viral empêchant ainsi la réplication virale et l'infection de nouvelles cellules (Barre-Sinoussi, Ross, & Delfraissy, 2013). En 1987, la FDA approuve le premier médicament antirétroviral, la zidovudine mieux connue sous le nom de AZT (3'-azido-3'-deoxythymidine). L'AZT est un inhibiteur nucléosidique de la transcription inverse (INTI), analogue au nucléotide thymine. Même si dans un premier temps l'AZT semble efficace et réduit la production virale, très vite le virus développe une résistance à cette monothérapie (Larder, Darby, & Richman, 1989). Les INTIs développées par la suite sont tout aussi inefficaces sur le long terme en mono ou bi thérapies car le virus développe des mécanismes de résistance pour chacun d'entre eux (Kirschner & Webb, 1997).

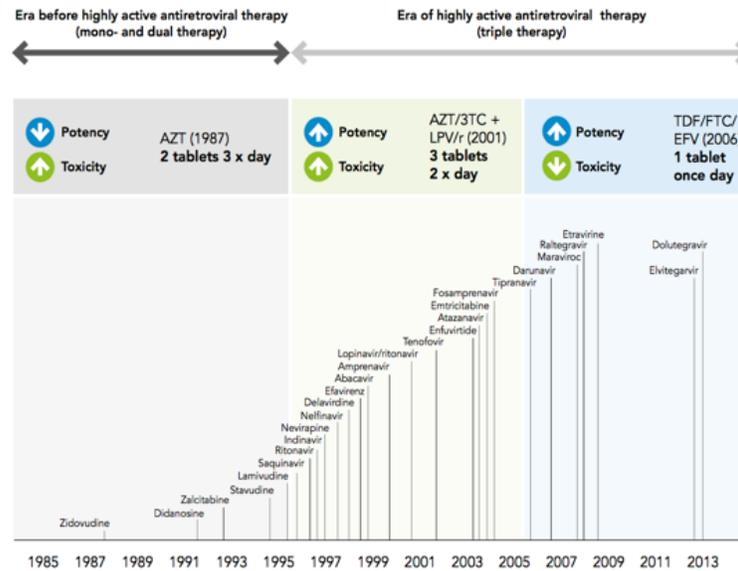


Figure 7. Chronologie des antirétroviraux contre le VIH de 1986 à 2013

Source (UNAIDS, 2014)

En 1994, le premier inhibiteur de protéase (IP) est développé (Lam et al., 1994) et est très efficace (D. D. Ho et al., 1995) mais une fois de plus, ne suffit pas par lui-même. L'année 1997 marque le début des combinaisons des antirétroviraux (cTAR), la plus courante comprend deux INTIs combinés avec un IP. Ces combinaisons sont un succès, elles réduisent la charge virale dans le sang à un niveau presque indétectable soit moins de 50 copies/mL et ce, sans développer de résistance (Brodt et al., 1997; Havlir et al., 2001). Ces cTAR permettent un rétablissement partiel du compte des cellules T CD4⁺. Cependant, les personnes sous traitements commencent à montrer de plus en plus d'effets secondaires et le traitement s'avère très lourd avec beaucoup de comprimés à prendre plusieurs fois par jour (Marcus Altfeld, 2015). À partir de 2006, la deuxième génération de IP et d'INTI, ainsi que l'introduction d'inhibiteur d'intégrase et d'inhibiteur d'entrée et de fusion, réduisent grandement les effets secondaires (Hughes, Barber, & Nelson, 2008) (figure 7). De plus, ces nouvelles cTAR sont sous forme d'une pilule par jour

(Nachega et al., 2014). Finalement en 2010, les personnes infectées, sous traitement, ont une espérance de vie presque similaire aux personnes non infectées (figure 8).

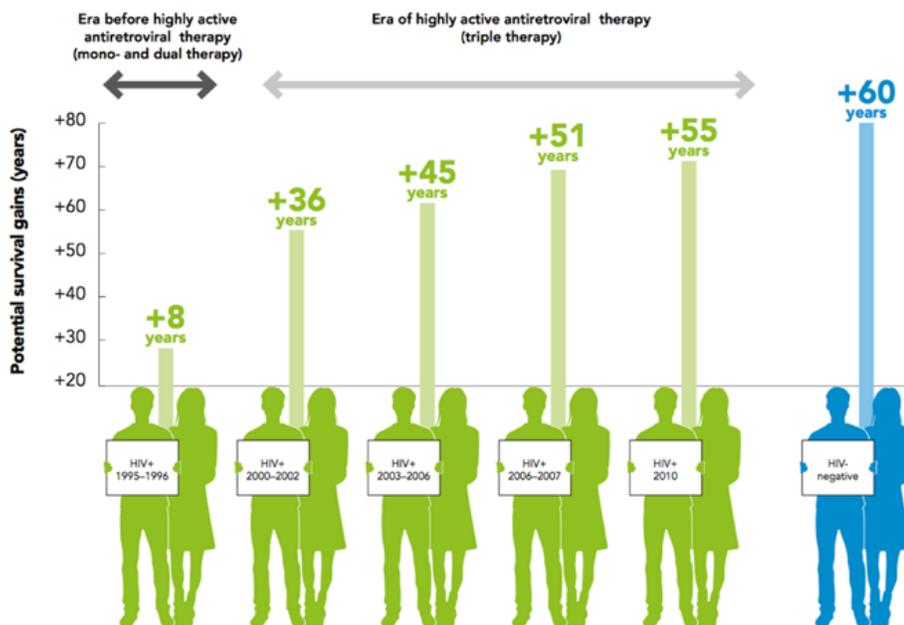


Figure 8. Évolution de l'espérance de vie des personnes vivant avec le VIH de 1995 à 2010

Source(UNAIDS, 2014)

1.3.2 Différentes catégories d'antirétroviraux

À ce jour, il y a plus de 30 antirétroviraux individuels ou en combinaison sur le marché. Ces différentes molécules sont classées en 4 catégories :

- Les inhibiteurs de la transcriptase inverse (RT)

Il existe deux catégories d'inhibiteurs de la RT, les inhibiteurs nucléosidiques dépendants (INTI) qui compétitionnent avec les nucléotides physiologiques. La structure des INTIs diffère légèrement des nucléotides naturels, leur permettant d'interagir avec les sites de liaison des

nucléotides sur la RT. Cependant, une fois incorporés les INTIs empêchent la synthèse d'un ADN viral double brin complet (Arts & Hazuda, 2012; Marcus Altfeld, 2015). Les INTIs les plus courantes sont notamment la Zidovudine (AZT) qui fut le premier médicament mis sur le marché contre le HIV. Puis, elle fut remplacée par la Lamivudine (3TC) et la Stavudine (d4T) qui font souvent parties des tri thérapies d'aujourd'hui.

La deuxième catégorie est un inhibiteur non-nucléosidique (INNTI). Contrairement aux INTIs, les INNTIs n'ont pas besoin que la cellule soit active car ils ne rivalisent pas avec un substrat. Les INNTIs se lient au niveau du site catalytique de la RT, changeant sa conformation bloquant le bon fonctionnement de l'enzyme (de Bethune, 2010; Marcus Altfeld, 2015). Aujourd'hui les INNTIs les plus courantes sont : l'Efavirenz (EFV), l'Etravirine (ETR), la Nevirapine (NVP) et la Rilpivirine (RPV)

- Les inhibiteurs de protéase (IP)

La protéase du VIH coupe la poly-protéine viral gag-pol afin de générer les sous-unités fonctionnelles essentielles à la formation de nouveau virions. Les inhibiteurs de protéase bloquent les sites d'action de l'enzyme prévenant toute production de protéines de structure et de nouvelles enzymes virales (Lv, Chu, & Wang, 2015). Depuis leur introduction en 1994, les premiers Inhibiteurs de protéase tel que Saquinavir ou Ritonavir ont été grandement améliorés. En 2006, de nouvelles IP comme le Darunavir sont rehaussées avec des composés additionnels qui renforcent leur attachement au site d'activité de la protéase, permettant de réduire la dose de IP et donc leur toxicité (Youle, 2007).

- Les inhibiteurs d'intégrase

L'intégrase est essentielle pour l'intégration de l'ADN double brin viral dans le génome de la cellule hôte. Sans intégration le VIH ne peut pas se répliquer (Li & De Clercq, 2016). Les inhibiteurs d'intégrase agissent à plusieurs étapes de l'intégration : au niveau de la liaison de l'ADN viral avec le complexe de l'intégrase (PIC), empêchant l'intégrase de cliver l'ADN en 3', bloquant le transfert au noyau ou encore en prévenant la réparation de l'ADN génomique post-intégration (Lataillade & Kozal, 2006). Les inhibiteurs d'intégrase actuellement utilisés sont : le Dolutegravir, le Raltegravir et l'Elvitegravir.

- Les inhibiteurs d'entrée

L'entrée du virus dans une cellule T CD4⁺ est une étape cruciale du cycle viral car le VIH ne peut pas se répliquer hors d'une cellule hôte. L'entrée se fait en trois étapes et les inhibiteurs d'entrée agissent à ces différents niveaux. Ils bloquent ou affaiblissent la liaison de la gp120 avec le récepteur CD4⁺, c'est le cas de l'anticorps monoclonal Ibalizumab qui empêche une liaison optimale. L'inhibition se fait aussi au niveau de la liaison avec les chimiokines CCR5 et CXCR4, l'inhibiteur le plus répandu étant le Maraviroc qui rivalise pour la liaison avec CCR5. Finalement il existe aussi des inhibiteurs de fusions, l'Enfuvirtide (T-20) est constitué d'oligopeptides qui s'insèrent entre l'enveloppe du virus et la membrane lipidique de la cellule prévenant leur fusion (Kuritzkes, 2009; Marcus Altfeld, 2015).

1.3.3 Les limitations des antirétroviraux

Les antirétroviraux ont grandement amélioré la vie des personnes vivant avec le VIH. Cependant le traitement en lui-même n'est pas suffisant car il ne permet pas d'éradiquer le VIH (Deeks et al., 2016). En effet le virus persiste sous forme latente et toute interruption de cTAR conduit à un rebond viral dans les quelques semaines qui suivent (T.-W. Chun, Davey Jr, Engel, Lane, & Fauci, 1999). Ainsi, les personnes infectées doivent prendre un traitement journalier à vie et ces thérapies sont très coûteuses. Aux États-Unis, un cTAR à vie pour une personne infectée à 35 ans coûte 326,500 USD (Schackman et al., 2015). De plus, les antirétroviraux n'abrogent pas entièrement l'inflammation (Vinikoor et al., 2013; Wada et al., 2015) et ne rétablissent pas le compte des cellules T CD4⁺ à un niveau initial notamment dans l'intestin (Mehandru et al., 2006). D'autre part, les personnes vivant avec le VIH subissent toujours de nombreuses discriminations de par leur statut de séropositif et ce malgré l'introduction des thérapies (Avert, 2017). Finalement, même si en Juin 2017, 20,9 millions sur 36,7 millions de personnes infectées sont traitées, il reste 15,8 millions de personnes vivant avec le VIH qui n'ont toujours pas accès aux cTAR (UNAIDS, 2017). En résumé, l'introduction de TAR a grandement amélioré le niveau de vie des personnes infectées y ayant accès seulement. De plus, ces traitements sont à prendre à vie car ils n'éradiquent pas le virus en phase latence, ainsi, ils ne sont pas une solution sur le long terme.

1.4 Réservoirs du VIH

Le VIH s'intégrant principalement dans le génome des lymphocytes T CD4⁺, il peut donc persister au sein de ces cellules sous forme latent, soit sans être transcrit. Au cours de l'infection,

plus de 80% des lymphocytes T CD4⁺ infectés sont éliminés, cependant un petit nombre de ces cellules infectées persistent malgré l'initiation des antirétroviraux (T. W. Chun et al., 1997; Finzi et al., 1997; Wong et al., 1997). Le réservoir du VIH commence à s'établir très tôt dans les deux premières semaines de la phase aiguë de l'infection (Ananworanich et al., 2016; Henrich et al., 2017). Une étude chez les primates non-humains a même montré qu'un réservoir répliquatif compétant du VIS est établi après trois jours d'infection, alors que la charge virale dans le plasma n'est pas encore détectable (Whitney et al., 2014). À long terme, ce réservoir reste stable sous traitement et d'après une modélisation mathématique, il faudrait plus de 73 ans de TAR afin de l'éliminer 1 millions de cellules infectées (Chomont et al., 2009; Siliciano et al., 2003). Le réservoir du VIH est donc l'obstacle majeur vers une guérison (Deeks et al., 2016).

1.4.1 La compartimentation du réservoir du VIH

La persistance du VIH se fait principalement au sein des lymphocytes T CD4⁺. Il faut toutefois noter qu'un certain nombre de cellules myéloïdes peuvent être infectées et contribuent au réservoir du VIH. Notamment, il a été démontré que les macrophages différenciés et résidents dans les tissus tel que les cellules de Kupffer du foie, les macrophages alvéolaires des poumons et les cellules microglies du cerveau peuvent survivre de semaines voire des années. Ainsi, des études ont observé que le VIH persiste et forme un réservoir parmi ces macrophages tissus résidents.

Néanmoins, les lymphocytes T CD4⁺ de par leurs très longues demi-vies et leur état de repos forment la majorité du réservoir du VIH. Au sein des lymphocytes T CD4⁺, certaines sous-populations de par leur localisation, demi-vies et statuts de réactivation sont aussi plus propices

à la persistance du virus. De plus, la fréquence des lymphocytes T CD4⁺ diffère d'un organe à un autre, avec une forte densité des cellules T CD4⁺ résidents dans les tissus périphériques. Ainsi les cellules T CD4⁺ contribuant au réservoir du VIH ont une répartition hétérogène au sein du corps humain.

- Sous-population des lymphocytes T CD4⁺ :

La majorité du réservoir du VIH se trouve au sein des lymphocytes T CD4⁺ mémoires, soit les centrales (T_{cm}), transitionnelles (T_{tm}) et effectrices (T_{em}) mémoires respectivement (Chomont et al., 2009; Douek et al., 2002; Siliciano et al., 2003) (figure 9). En effet, les cellules mémoires ont une longue demi vie et maintiennent un état de quiescence essentiel pour éviter la détection du virus par le système immunitaire (Lees & Farber, 2010; Sallusto, Geginat, & Lanzavecchia, 2004). Notamment, les cellules T CD4⁺ centrales mémoires contribuent majoritairement au réservoir du VIH (Chomont et al., 2009). Toutefois, les cellules T CD4⁺ transitionnelles et effectrices mémoires qui sont plus différenciées et plus promptes à être réactivées, contiennent elles aussi un grand nombre de virus persistants (G. Q. Lee & Lichterfeld, 2016). À l'inverse, les cellules T CD4⁺ naïves sont moins permissives à la plupart des souches du VIH car elles expriment peu du corécepteur CCR5 essentiel à l'entrée virale (B. Lee, Sharron, Montaner, Weissman, & Doms, 1999). Néanmoins, un faible niveau d'ADN viral intégré est détecté au sein des cellules T CD4⁺ naïves chez la plupart des individus infectés sous traitement (Fabre-Mersseman et al., 2011; Wightman et al., 2010). Finalement, de récentes études ont montré que le VIH persiste dans une certaine mesure au sein des « cellules souches » T CD4⁺ mémoires (T_{scm}), qui ont un phénotype intermédiaire entre les naïves T CD4⁺ et les cellules mémoires T CD4⁺ (Buzon, Sun, et al., 2014; Jaafoura et al., 2014).

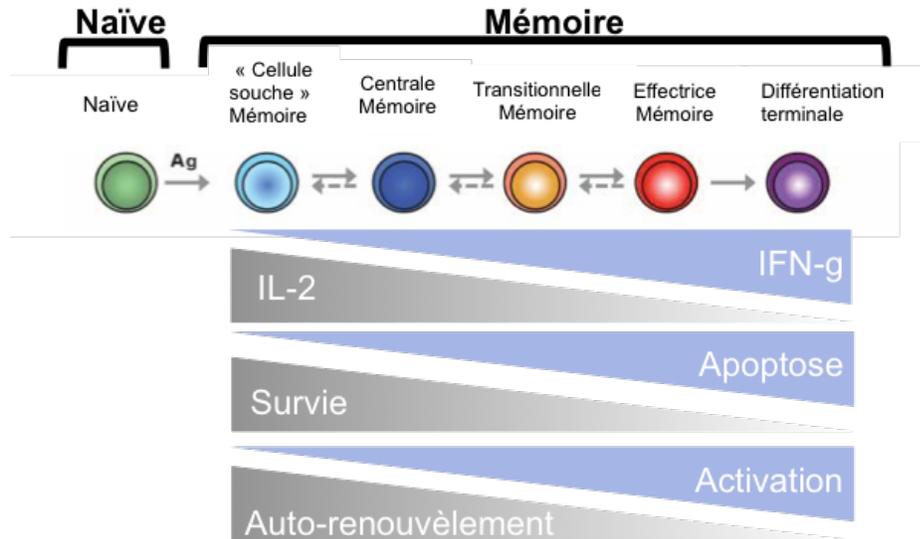


Figure 9. Caractéristique des sous-populations des cellules T CD4⁺

Les cellules T CD4⁺ peuvent être divisées en deux catégories les cellules naïves et les cellules mémoire. Il y a différentes sous-population au sein de cellules mémoires. Les cellules T CD4⁺ mémoires évoluent vers une sous-population plus différenciée suite à la représentation de l'antigène acquérant des caractéristiques propres à chaque stade. Adapté de (Kulpa & Chomont, 2015)

- Compartimentation anatomique

Moins de 2% des lymphocytes totaux du corps humain sont présents dans le sang. La majorité des lymphocytes sont concentrées dans les organes lymphoïdes secondaires tel que les ganglions lymphatiques, la rate ou les tissus lymphoïdes associées aux muqueuses (Ganusov & De Boer, 2007). Ainsi, la plupart des cellules infectées sont localisées au sein de ces tissus (Kulpa & Chomont, 2015; Svicher, Ceccherini-Silberstein, Antinori, Aquaro, & Perno, 2014). L'intestin, où l'inflammation est très forte durant l'infection, est un compartiment avec un grand nombre de lymphocytes activés et de cellules T CD4⁺ effectrices mémoires (Sathaliyawala et al., 2013) amenant à l'établissement d'un réservoir du VIH au sein de ce tissu. De plus, l'activation permanente du système immunitaire au sein de l'intestin et la mauvaise pénétration des

antirétroviraux favorise une réplication à bas bruit du virus optimisant sa maintenance au sein de ce compartiment (T. W. Chun et al., 2008; Yukl et al., 2010). Quant aux ganglions lymphatiques, ils sont un sanctuaire préférentiel pour le réservoir du VIH. Tout d'abord, les antirétroviraux pénètrent aussi moins efficacement dans les ganglions lymphatiques. De plus, les cellules T CD4⁺ folliculaires auxiliaires (Tfh), qui résident spécifiquement dans les ganglions lymphatiques, ont une haute fréquence d'infection et persistent sous TAR. En effet, ces Tfh sont localisées dans le centre germinatif où les cellules T CD8⁺ ne peuvent pénétrer et éliminer les Tfh infectés. (Fukazawa et al., 2015; Perreau et al., 2013; Sathaliyawala et al., 2013). Finalement, d'autres compartiments tels que le cerveau et les tractus génitaux féminin et masculin pourraient aussi servir de réservoir pour le VIH à long terme (Gray et al., 2014). Toutefois leur contribution à la persistance du VIH n'est pas clairement définie. Le virus est cependant détecté au cours de l'infection dans le système nerveux central (CNS) (Harrington et al., 2009; Schnell, Spudich, Harrington, Price, & Swanstrom, 2009) et la production virale est quantifiée dans les voies génitales de personnes traitées (Gianella et al., 2013; Halfon et al., 2010; Jenabian et al., 2016; Launay et al., 2011).

1.4.2 La maintenance du VIH

Ce réservoir se maintient sous TAR par deux mécanismes principaux (figure 10). Dans une moindre mesure, le VIH forme un réservoir actif due à un faible niveau de la réplication virale persistant sous TAR (Buzon et al., 2010; Palmer et al., 2008). De nombreux tissus tel que l'intestin, le cerveau, les ganglions lymphatiques sont moins permissifs aux antirétroviraux (Fletcher et al., 2014). Ces tissus ont aussi une forte concentration de cellules T CD4⁺ rassemblant un grand nombre de cellules infectées et facilitant l'infection de cellule à cellule chez des individus où la charge virale est indétectable. De plus, de nombreuses co-infections ou

bactéries activent le système immunitaire et notamment les cellules mémoires T CD4⁺ infectées en réponse à un antigène, amenant à la production de nouveaux virions et à l'infection de nouvelles cellules au sein de tissus peu permissifs à TAR. Ainsi, la réplication virale à faible niveau dans les tissus conduit à une inflammation résiduelle et à une perpétuation du réservoir du VIH (Fletcher et al., 2014; Lorenzo-Redondo et al., 2016; Massanella, Fromentin, & Chomont, 2016).

Cependant, la majorité du réservoir du VIH est retrouvée dans un état latent au sein des lymphocytes T CD4⁺ mémoires au repos (Chomont et al., 2009; Garcia, Buzon, Benito, & Rallon, 2018). En effet, ces cellules mémoires T CD4⁺ ont une demi vie d'en moyenne 44 mois (Siliciano et al., 2003). Suite à l'initiation du traitement et en réponse à l'augmentation du niveau d'IL-7, les lymphocytes T CD4⁺ mémoires prolifèrent grandement afin de combler le vide laissé par la déplétion des cellules T CD4⁺. À plus long terme sous TAR le niveau de IL-7 baisse mais reste suffisant pour permettre aux cellules T CD4⁺ mémoires de se diviser de façon homéostatique (Vandergeeten et al., 2013). Des études ont aussi montré que la persistance du virus est directement liée à la prolifération des cellules T CD4⁺ mémoires car le VIH s'intègre dans des régions génomiques qui favorisent l'expansion clonale, notamment dans des sites de régulation du cycle cellulaire (Maldarelli et al., 2014; Wagner et al., 2014). Ainsi, ce réservoir latent persiste toute la vie et subit peu de variations génétiques (Finzi et al., 1999; Josefsson et al., 2013; von Stockenström et al., 2015).

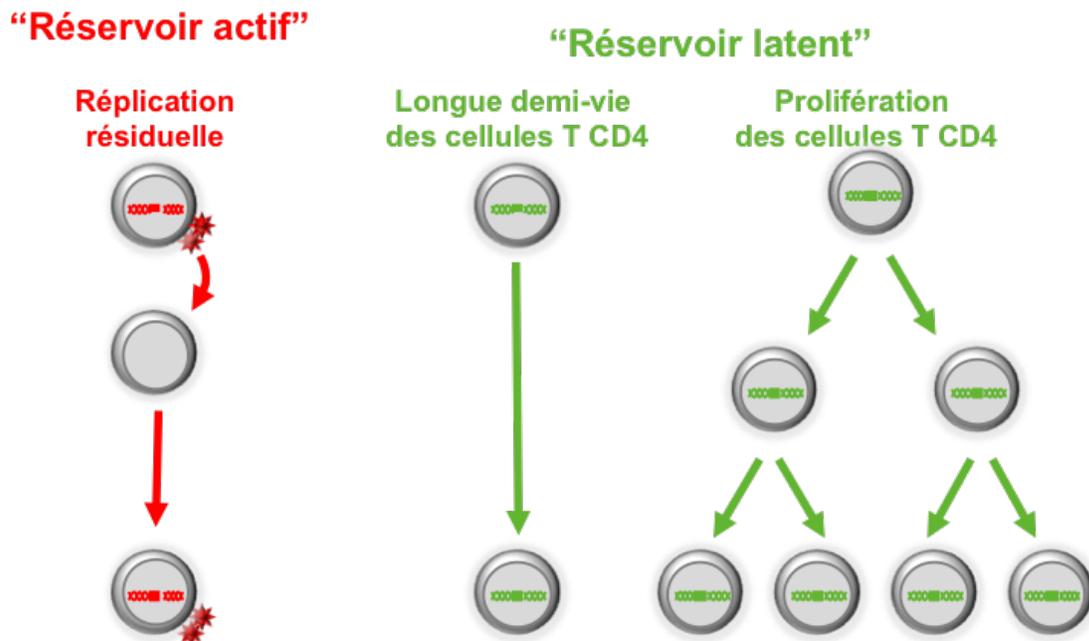


Figure 10. Persistance du réservoir du VIH

Le réservoir du VIH se maintient grâce à la longue demi vie et au renouvellement de cellules mémoires T CD4⁺ contenant le virus. D’autre part, l’inflammation et l’activation du système immunitaire permettent la production de virions infectant de nouvelles cellules dans les tissus où TAR est moins permissive. Source (Massanella et al., 2016) Figure empruntée avec autorisation au Dr. Nicolas Chomont.

1.4.3 Quantification des réservoirs du VIH

Il est très difficile d’identifier et de localiser le VIH persistant qui est à l’origine du rebond viral lorsque le traitement est interrompu. Tout d’abord, l’ADN viral n’est pas toujours intégré dans le génome et d’autre part 90% des génomes viraux sont défectifs (Katherine M. Bruner et al., 2016; Eriksson et al., 2013; Y.-C. Ho et al., 2013). Ainsi les essais basés sur les mesures PCR de l’ADN viral total ou intégré surestiment largement la taille du réservoir (Butler, Hansen, & Bushman, 2001; O’Doherty, Swiggard, Jeyakumar, McGain, & Malim, 2002; Vandergeeten et al., 2014). Néanmoins, ces méthodes sont très sensibles pouvant détecter jusqu’à une copie de VIH dans 1 million de cellules (Vandergeeten et al., 2014). À l’extrême inverse, le « quantitative

viral outgrowth assay » QVOA, une mesure quantitative en dilution de la croissance virale, est considéré comme la méthode de référence des réservoirs du VIH. Le QVOA quantifie exclusivement la fréquence des cellules T CD4⁺ capables du produire du virus compétent pour la réplication après plusieurs jours de stimulation. Une limite de cette méthode est que les cellules T CD4⁺ au repos ne sont pas toujours réactivées in vitro et certaines cellules infectées contiennent un génome viral intact mais ce dernier est non transcrit. Ainsi, le QVOA ne comptabilise pas ces cellules et sous-estime la taille du réservoir capable de réplication (K. M. Bruner, Hosmane, & Siliciano, 2015; Siliciano & Siliciano, 2005). Finalement, cette méthode requiert un grand nombre de cellules T CD4⁺. Entre ces deux extrêmes, plusieurs méthodes ont été mises au point afin de quantifier le génome intact du VIH (Hiener et al., 2017), les cellules capables de produire de l'ARN viral (Baxter et al., 2017; Cillo et al., 2014; Procopio et al., 2015), des protéines virales ou des virions complets. Cependant, la taille du réservoir du VIH reste difficile à estimer et se trouve à l'intersection de ces différents tests (figure 11).

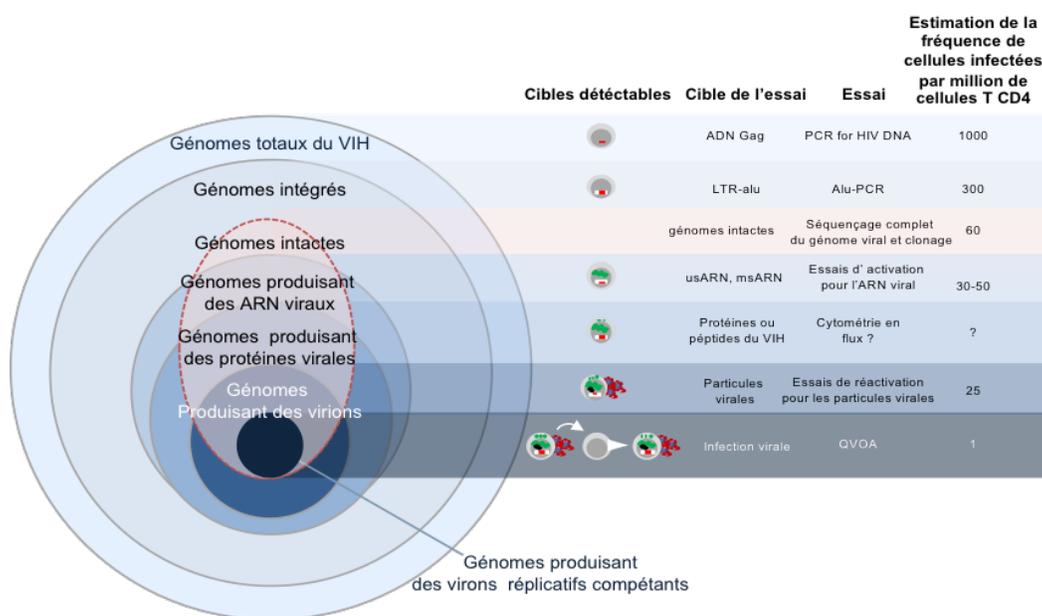


Figure 11. Les différents essais pour quantifier le réservoir du VIH

Il existe plusieurs méthodes pour mesurer le réservoir du VIH. Chaque technique a ses avantages et ses inconvénients souvent sur ou sous estimant la taille réelle du réservoir. Adapté de (Deeks et al., 2016)

1.5 Vers une rémission du VIH

De nombreuses stratégies ont été mises en place afin de réduire la taille du réservoir du VIH pour permettre une guérison fonctionnelle telle que la stratégie « shock and kill » où les cellules infectées sont réactivées afin de pouvoir les éliminer. Cependant, les études récentes utilisant cette stratégie ont montré peu voire aucun impact sur la taille du réservoir (Kim, Anderson, & Lewin, 2018). À ce jour, seule l’initiation du traitement en phase précoce de l’infection réduit la taille du réservoir (Archin et al., 2012; Buzon, Martin-Gayo, et al., 2014; Hocqueloux et al., 2013; Strain et al., 2005)(figure 12).

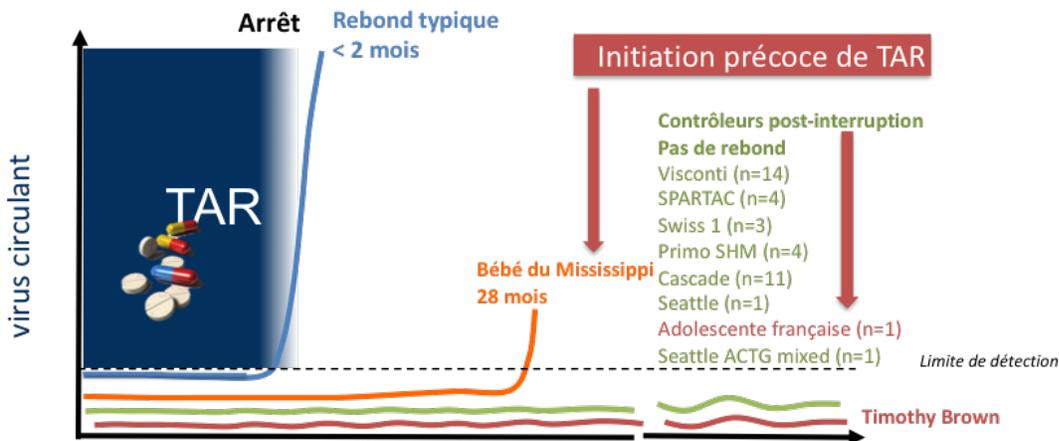


Figure 12. Cas de contrôle du virus post interruption d'un traitement initiée en phase aiguë

Adapté de (Deeks et al., 2016)

1.5.1 Guérison complète N=1

À ce jour, une seule personne est considérée comme "guérie" de l'infection par le VIH. Il s'agit de Timothy Brown plus connu sous le nom « du patient de Berlin » (Hutter et al., 2009). Cette personne s'est infectée à la fin des années 90 et 10 ans plus tard, après avoir été traité avec la trithérapie pendant 4 ans, elle a développé une leucémie myéloïde aigüe. À la suite d'une irradiation corporelle totale, il a subi deux greffes de cellules souches allogéniques d'un donneur compatible qui présente un génotype homozygote CCR5-Delta32. Cet allèle conduit à la délétion d'une portion du gène de CCR5 et le peu de personnes homozygotes pour ce locus sont généralement résistantes à l'infection du VIH (Galvani & Novembre, 2005; Novembre, Galvani, & Slatkin, 2005). Dans les mois qui ont suivi la transplantation, sans aucun traitement, le VIH est demeuré indétectable et cela fait maintenant 10 ans que Timothy Brown vit sans trace de son infection. Néanmoins, cette solution n'est pas applicable à toute la population vivant avec le VIH car l'opération reste très lourde avec une mortalité élevée et il est impossible d'identifier un donneur CCR5-Delta32 homozygote compatible pour 36,7 millions de personnes.

1.5.2 Initiation précoce de TAR amène à un rebond viral retardé post-interruption

De nombreux nourrissons ont commencé les antirétroviraux quelques jours ou semaines après leur naissance. Notamment, le cas très connu du bébé du Mississippi ayant initié TAR seulement 2 jours après sa naissance et arrêté le traitement 18 mois plus tard. L'enfant a maintenu une charge virale indétectable pendant plus de 28 mois avant de faire un rebond viral (Luzuriaga et al., 2015). Néanmoins, toutes les personnes ayant initié un traitement dans la phase primaire de

l'infection ne présentent pas ce retard de retour de virémie après l'interruption du traitement (Fidler et al., 2013; Giacomet et al., 2014).

1.5.3 Initiation précoce de TAR amène à un contrôle de la virémie post-interruption

D'autres cas suggèrent que l'initiation précoce des antirétroviraux permet un contrôle du virus à la suite d'une interruption de traitement. La cohorte VISCONTI où 14 individus ayant initié TAR dans la phase aiguë de l'infection (stade Fiebig III), soit après séroconversion, est un bon exemple. En effet, une fois le traitement interrompu, ces personnes contrôlent leur charge virale pendant plus de 5 ans (Saez-Cirion et al., 2013). Un autre exemple est celui de la jeune française traitée moins de 6 mois après la naissance jusqu'à 5-6 ans avant d'arrêter le traitement. Pendant plus de 11 ans l'ARN viral reste à 4 copies par mL de sang. Aujourd'hui, la jeune fille a 18 ans et contrôle toujours sa charge virale (Frangé et al., 2016). Dans la recherche d'une cure fonctionnelle, d'autres études ont confirmé que l'initiation de TAR en phase aiguë amenait à un contrôle de la virémie chez certaines personnes (Fidler et al., 2013; Hocqueloux et al., 2010; Lodi et al., 2012; Salgado et al., 2011).

1.6 Rationnel et hypothèses

À ce jour, seule l'initiation précoce de TAR semble impacter la taille du réservoir du VIH. En effet, les personnes infectées commençant le traitement moins de 6 mois après l'infection ont un réservoir plus restreint comparativement aux personnes traitées durant la phase chronique

(Archin et al., 2012; Buzon, Martin-Gayo, et al., 2014; Hocqueloux et al., 2013; Strain et al., 2005). Toutefois, tous les cas où TAR est initiée précocement au cours de l'infection, ne mènent pas forcément à un retard du rebond viral ou à un contrôle de la virémie suite à une interruption du traitement. Des études ont montré que des personnes traitées très précocement au cours de l'infection subissent un rebond viral rapide à la suite d'une interruption de TAR (Colby et al., 2018). Ainsi, un réservoir répliatif du VIH s'établit dès les premières semaines d'infection (T. W. Chun et al., 1998) et chez les primates non-humain, il a été démontré que le réservoir du SIV dans les cellules T CD4⁺ de longue vie s'établit dès les trois premiers jours de l'infection et ce avant même que l'ARN viral soit détectable dans le sang (Whitney et al., 2014). Toutes ces observations suggèrent que le réservoir du VIH s'établit très tôt et persiste à faible fréquence malgré l'initiation de TAR. Cependant jusqu'à présent avec la difficulté d'obtenir des échantillons de sang et de tissus de personnes en infection aiguë limitait les connaissances sur les tissus et les sous-population cellulaires où s'établit le réservoir du VIH en premier lieu. En effet, toutes les études précédentes sur l'étude du réservoir en phase aiguë d'infection sont faites sur des échantillons sanguins. Cependant, les tissus lymphoïdes contiennent plus des lymphocytes T CD4⁺ et sont reconnus comme des sites préférentiel pour la persistance du VIH sous TAR (T. W. Chun et al., 2008; Perreau et al., 2013; Svicher et al., 2014; Yukl et al., 2010). Ainsi, il est essentiel d'identifier les compartiments et les sous-population cellulaires où s'établit et persiste le réservoir du VIH sous TAR.

Hypothèse : L'initiation de TAR en phase aiguë agit sur la taille du réservoir car le virus est majoritairement intégré dans des cellules T CD4⁺ activées de courte vie, localisées au sein de tissus lymphoïdes inflammés, et non dans les cellules T CD4⁺ mémoires de longue vie au repos

à ce moment de l'infection. Cependant, un petit nombre de cellules infectées capable de répliquer viral arrivent à persister sous TAR dans les tissus lymphoïdes.

Le premier objectif est d'identifier à quel moment de l'infection aiguë le réservoir du VIH commence à s'établir et dans quels tissus.

Le second objectif est de mesurer l'impact de l'initiation de TAR à différents moments de la phase aiguë sur la taille du réservoir du VIH et de quantifier les cellules infectées persistant sous TAR selon les différents compartiments.

Enfin, le troisième objectif consiste à étudier l'établissement du réservoir du VIH au sein des différentes sous-populations des cellules T CD4⁺ afin de définir l'impact de l'initiation de TAR sur la distribution du réservoir dans ces sous-types cellulaires.

Chapitre 2 : Méthodologie

2.1 Les cohortes

Cette étude a été réalisée en collaboration avec le MHRP (Military HIV Research Program) basé à Washington DC (États Unis) et l'équipe SEARCH du Centre de recherche sur le SIDA de la Croix Rouge à Bangkok (Thaïlande). Des personnes infectées par le VIH sont suivies périodiquement en Thaïlande au sein de différentes cohortes prospectives à travers cet organisme. Les participants sont recrutés dans la cohorte de phases aiguë ou chronique, en fonction du temps écoulé entre la date estimée de l'infection par le VIH et la date de recrutement.

2.1.1 Cohorte d'individus en phase aiguë

Au sein de la cohorte RV254/SEARCH010 (clinicaltrials.gov NCT00796146), les personnes infectées sont recrutées en phase aiguë de l'infection au centre de recherche de la Croix Rouge sur le SIDA de Bangkok. Pour identifier les personnes en phase aiguë de l'infection, des volontaires non-infectés mais à haut risque d'infection sont fréquemment testés avec un test d'acide nucléiques très sensible (NAT) identifiant l'ARN viral (Ananworanich et al., 2012). Si le test est positif, une série de mesures immunologiques et virologiques sont effectuées afin d'estimer la durée de l'infection. Les individus en la phase aiguë sont par la suite recrutés et classifiés selon le stade Fiebig en fonction de la positivité des tests virologiques et immunologiques (Fiebig et al., 2003)(Tableau I). Cette cohorte prospective a déjà engagé 512 individus diagnostiqués en phase aiguë de l'infection. Un régime de trithérapie antirétrovirale comprenant en général TDF/FTC/EFV (Tenofovir, Emtricitabine, Efavirenz) est offert à tous les participants et est initié en médiane 0 jours après le recrutement. De plus, 31% des participants prennent en plus de traitement général du MVC (Maraviroc) et du RAL (Raltegravir).

Tableau I. Tests pour la classification Fiebig

	ARN viral	ELISA Antigène p24	ELISA anticorps p24	Immunobuvardage de type Western anticorps p24	Immunobuvardage de type Western anticorps p31	Immunobuvardage de type Western non-IgM
Fiebig I	+	-	-	-	-	-
Fiebig II	+	+	-	-	-	-
Fiebig III	+	+	+	-	-	-
Fiebig IV	+	+	+	+	-	-
Fiebig V	+	+	+	+	+	-
Chronique	+	+	+	+	+	+

Les échantillons de 170 participants ont été utilisés pour cette étude, incluant 24 Fiebig I, 47 Fiebig II, 70 Fiebig III et 29 Fiebig IV/V. Toutes les personnes enrôlées ont signé un consentement écrit décrivant le projet avant de donner du sang, des ganglions et/ou des biopsies de l'intestin. En moyenne, la durée estimée de l'infection avant le diagnostic pour chaque stade Fiebig de cette cohorte est de 15 (FI), 16 (FII), 19 (FIII) et 22 (FIV/V) jours, respectivement.

2.1.2 Cohortes contrôles de personnes en phase chronique

Les Cohortes RV304 (NCT01397669) (Schuetz et al., 2014) et SEARCH011 (NCT00782808) (Chalermchai et al., 2013) sont aussi localisées au centre de recherche de la Croix Rouge sur le SIDA à Bangkok. Ces cohortes ont été utilisées comme contrôle dans notre étude. Dans ce cas, il s'agit de personnes diagnostiquées en phase chronique de l'infection et pour lesquels tous les tests immunologiques même les moins sensibles pour détecter le VIH, sont positifs. Pour ce projet, les échantillons de 26 individus de la cohorte RV304 et 32 individus de la cohorte SEARCH011 ont été utilisés. Les participants ont signé un consentement éclairé avant de donner du sang, des ganglions et/ou des biopsies de l'intestin et ont eu l'opportunité d'initier le traitement.

2.2 Mesures virologiques

Les participants des différentes cohortes sont suivis pendant plus de deux ans et aujourd'hui encore continuent de visiter la clinique à intervalles réguliers. À chaque visite des prélèvements sanguins sont réalisés et l'ARN viral dans le plasma est mesuré en utilisant le test Roche Amplicor version 1.5, sensible jusqu'à 50 copies par mL de plasma (Diagnostic Roche, Branchburg, NJ, USA). Sur les mêmes prélèvements sanguins, les comptes absolus et les pourcentages de cellule T CD4⁺ et CD8⁺ sont estimés par cryométrie en flux à l'aide de billes de comptage.

2.3 Préparation et conservation des échantillons

2.3.1 Isolation des cellules mononucléaires du sang (PBMCs)

En Thaïlande, les PBMCs sont isolées du sang périphérique et de leucaphérèses grâce à la technologie LymphoprepTM de Stemcell (# 07861). Brièvement, le sang complet est dilué 1:1 dans du milieu RPMI et est doucement superposé sur 15mL de LymphoprepTM. La préparation est centrifugée à 20000 rpm pendant 30 min. À la suite de la centrifugation, l'anneau blanc contenant les PBMCs est récolté. Les PBMCs sont lavées 2 fois avec du RPMI puis elles sont congelées dans du FBS 10% DMSO (10 à 50 millions de cellules par tubes) et stockées dans des tanks d'azote liquide avant d'être envoyées au CRCHUM dans l'azote liquide.

2.3.2 Isolation des cellules mononucléaires du ganglions lymphatiques (LNMCs)

Les ganglions lymphatiques inguinaux sont extraits par une intervention chirurgicale. La partie grasseuse est ensuite retirée, les ganglions lymphatiques sont écrasés et transférés sur un filtre de nylon de 70 mm posé sur un tube de 50mL. Après filtration, les LNMCs sont lavés 2 fois avec du RPMI et elles sont congelées dans du FBS 10% DMSO. Elles sont stockées dans des tanks d'azote avant envoi.

2.3.3 Biopsies de colon

Les biopsies de colon sigmoïde sont prélevées par sigmoïdoscopie en utilisant la technique Radial Jaw 3 biopsy forceps (Boston Scientific, Natick, MA, USA). Par la suite, les biopsies sont conservées dans le RNAlater à - 80°C jusqu'à leurs envois au CRCHUM.

2.4 Quantification des réservoirs du VIH

La taille du réservoir du VIH est mesurée en utilisant différentes techniques afin d'évaluer et caractériser la dynamique du réservoir avant et après initiation de TAR.

2.4.1 Mesure de l'ADN total et intégré du VIH ainsi que des cercles 2-LTR

L'ADN du VIH (total, intégré et cercles 2-LTR) est mesuré afin de quantifier de façon très sensible les marqueurs de la persistance du VIH. Les PBMCs des individus infectés sont

décongelées dans un bain-marie à 37°C puis elles sont transférées dans 4mL de FBS et le tube est complété à 45mL avec de RPMI. Des culots secs de 1 millions de PBMCs sont ensuite préparés. Par la suite, les PBMCs sont digérées dans de la protéinase K (PK) (cat. Invitrogen#25530-015) à raison de 15µL de PK pour 80 000 cellules. La digestion se fait dans un bloc agitateur chauffant pendant 12-16h à 55°C, 450rpm puis l'enzyme est inactivée pendant 5 min à 95°C.

Les fréquences de cellules contenant de l'ADN total, intégré du VIH et les cercles 2-LTR sont quantifiées au moyen d'une PCR niché composée d'une pré-amplification suivie d'une PCR en temps réel comme précédemment décrit dans (Vandergeeten et al., 2014). En parallèle de la quantification du VIH, le gène de référence CD3 est aussi quantifié pour mesurer précisément le nombre de cellules utilisées. Brièvement, l'ADN total, intégré du VIH et les cercles 2-LTR sont pré-amplifiés avec un volume de réaction par puits de 50µL comprenant : du buffer 1x Taq polymérase (Invitrogen 10342020), 3mM MgCl₂, 300µM de dNTP, 300nM de chaque amorce (Tableau II), 2,5U de Taq Polymérase (Invitrogen 10342020) et 15µL de lysat cellulaire. La PCR de l'ADN total et intégré comprennent 12 cycles d'amplification alors que les cercles 2-LTR en ont 16 (Tableau III). Pour chaque échantillon des triplicatas sont réalisés avec 80 000 cellules par puits. Des cellules ACH-2 qui possèdent une copie de l'ADN viral intégré et expriment le récepteur CD3, sont utilisées afin de générer une courbe standard pour les essais d'ADN total et intégré du VIH. Les ACH-2 sont diluées en dilution sérielle de 1/10 en commençant à 3x10⁵ jusqu'à 3 cellules. Pour la PCR des cercles 2-LTR, un plasmide contenant les séquences cibles de CD3 et 2-LTR est utilisé comme standard.

Tableau II. Séquences des amorces de pré-amplification pour les PCR de l'ADN viral

Amorces CD3	Amorces VIH total	Amorces VIH intégré	Amorces cercles 2-LTR
HCD3 out 5' : 5'-ACT GAC ATG GAA CAG GGG AAG-3'	ULF1 : 5'- ATG CCA CGT AAG CGA AAC TCT GGG TCT CTC TDG TTA GAC-3	ULF1 : 5'-ATG CCA CGT AAG CGA AAC TCT GGG TCT CTC TDG TTA G AC-3' Alu1 : 5'-TCC CAG CTA CTG GGG AGG CTG AGG-3' Alu2 : 5'-GCC TCC CAA AGT GCT GGG ATT ACA G-3'	ULLTRF1 : 5'- ATG CCA CGT AAG CGA AAC TCC TCA ATA AAG CTT GCC TTG A-3' ULTRR1 : 5'-CTA ACM AGA GAG ACC CAG TAC-3'
HCD3 out 3' : 5'-CCA GCT CTG AAG TAG GGA ACA TAT-3'	UR1 : 5'- CCA TCT CTC TCC TTC TAG C -3'		

Tableau III. Conditions des pré-amplification pour les PCR de l'ADN viral

VIH TOTAL	°C	temps	VIH INTEGRE	°C	temps	Cercles 2LTR	°C	temps
Dénaturation	95	8min	Dénaturation	95	8min	Dénaturation	95	8min
Cycles * 12	95	1min	Cycles * 12	95	1min	Cycles * 16	95	30sec
	55	40sec		55	1min		55	30sec
	72	1min		72	10min		72	1min
Elongation	72	15min	Elongation	72	15min	Elongation	72	5min
Conservation	4	-	Conservation	4	-	Conservation	4	-
Mode de stimulation GeneAmp			Mode de stimulation GeneAmp			Mode de stimulation GeneAmp		

La seconde amplification se fait en temps réel sur le Rotor-Gene Q (Qiagen) en utilisant 1x du mix quantinova (Qiagen Cat. 208256). La PCR est réalisée en deux étapes avec d'un côté la quantification du VIH et de l'autre la mesure du CD3. Le volume total de la réaction est de 20µL, incluant 6,4µL de l'amplification de la première PCR diluée 1/10, 1250nM de chaque amorce, 200nM de sonde fluorescente FAM Zen (longueur d'onde d'émission : 520nm) et 1 x de master mix. (Tableaux IV & V).

Tableau IV. Séquences des amorces d'amplification pour les post-PCR de l'ADN viral

Amorces & sonde CD3	Amorces & sonde VIH total/intégré	Amorces & sonde cercles 2-LTR
HCD3 in 5' : 5'-GGC TAT CAT TCT TCT TCA AGG T-3'	LambdaT : 5'-ATG CCA CGT AAG CGA AAC T -3'	LambdaT : 5'-ATG CCA CGT AAG CGA AAC T -3'
HCD3 in 3' : 5'-CCT CTC TTC AGC CAT TTA AGT A-3'	UR2 : 5'- CTG AGG GAT CTC TAG TTA CC-3'	ULTRR2 : 5'-GGT ACT AGC TTG AAG CAC CA -3'
CD3 FamZen : 5'-/56-FAM/AG CAG AGA A/ZEN/C AGT TAA GAG CCT CCA T/3IABkFQ/-3'	UHIV FamZen : 5'-/56-FAM/CA CTC AAG G/ZEN/C AAG CTT TAT TGA GGC /3IABkFQ/-3'	U2LTR FamZen : 5'-/56- FAM/AC TCT GGT A/ZEN/A CTA GAG ATC CCT CAG ACC /3IABkFQ/-3'

Tableau V. Conditions d'amplification en temps réel des PCR de l'ADN viral

2ème amplification en temps réel	°C	temps
Dénaturation	95	4min
Cycle * 40	95	3 sec
	60	10sec
		1 acquisition

Les quantifications de l'ADN du VIH ont aussi été effectuées dans les ganglions lymphatiques et l'intestin. Pour les ganglions lymphatiques, les LNMCs sont isolées comme décrit ci-dessus et la méthodologie décrite pour les PBMCs est appliquée sur des culots sec de 1 millions de LNMCs. Quant aux biopsies de colon, elles sont lavées deux fois dans du PBS et digérées entièrement dans un volume fixe de 250µL de PK. Dans un premier temps, une quantification du CD3 est faite avec le lysat des biopsies du colon non dilué et dilué 1/4 et 1/8, afin d'estimer

la dilution avec le plus grand nombre de copies de CD3, c'est-à-dire la dilution la plus sensible avec le moins d'inhibiteurs. Par la suite, l'ADN intégré du VIH est quantifié dans la dilution la plus sensible.

Les prélèvements sanguins étant moins invasifs, les quantifications d'ADN du VIH sont faites longitudinalement chez 80 participants traités en phase aigüe de l'infection à la semaine 0 avant l'initiation du traitement et sous TAR aux semaines : 2, 12, 24, 32, 48, 72, 96. Les autres quantifications notamment les mesures dans les tissus sont faites de façon cross-sectionnelle car un prélèvement longitudinal de ganglions lymphatiques ou de biopsies de colon est trop invasif pour un même patient. Ainsi les mesures cross-sectionnelles sont réalisés avant l'initiation du traitement (semaine 0) et sous TAR (semaine 24, 48 et 96). Au total, 319 échantillons de sang, 135 biopsies de colon et 65 échantillons de ganglions lymphatiques avant et sous TAR ont été utilisés.

2.4.2 TILDA « Essai de dilution limite de l'ARN tat/rev induit »

TILDA mesure la fréquence de cellule T CD4⁺ produisant des ARN épissés tat/rev, donnant ainsi une estimation plus proche du réservoir inductible capable de produire des virions. Les PBMCs sont décongelées des tubes cryoconservés comme décrit ci-dessus et les cellule T CD4⁺ sont enrichis par la technologie Stemcell (cat.19052) de déplétion magnétique négative, en suivant les indications des fabricants. Par la suite, la fréquence des cellules T CD4⁺ produisant (avec ou sans stimulation) de l'ARN épissé tat/rev est mesurée selon la méthode précédemment décrite dans (Procopio et al., 2015). Brièvement, les cellules T CD4⁺ des échantillons de participants non traités par TAR sont divisées en deux. La première partie est distribuée en dilution limite dans 5µL de tampon mix de réaction avec ROX (Invitrogen, 11745-100). Jusqu'à

24 répliques par dilution sont réalisés à raison de 1 μL par puits et de 4 dilutions de 18000, 9000, 3000 et 1000 cellules T CD4^+ par μL . L'autre partie des cellules T CD4^+ est mise en culture à une concentration de 2 millions de cellules par mL en présence d'antirétroviraux (20 μM de 3TC et RAL). Les cellules sont ensuite stimulées pendant 12 heures avec de la PMA (100ng/mL) et de la ionomycine (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) avant d'être distribuées en dilution limite comme détaillé ci-dessus. Pour les échantillons de participants traités avec charge virale indétectable, la fréquence des cellules produisant de l'ARN épissé tat/rev est quantifiée après stimulation seulement (puisque nos résultats précédents indiquent que les cellules produisant ces ARN spontanément sont extrêmement rares chez les individus traités par TAR, Procopio et al.).

Les plaques 384 contenant les dilutions sérielles des cellules sont par la suite conservées à -80°C avant d'effectuer la PCR en temps réel nichée. La rétrotranscription et la PCR de pré-amplification sont réalisées dans un volume de 11 μL avec 5 μL de tampon mix de réaction avec ROX, 1 μL de suspension cellulaire et de 5 μL de mix contenant : du tampon TE (2.2 μL), les deux amorces (0,125 μL à 20 μM), l'inhibiteur de RNase (0,1 μL), Taq Superscript Platinum III (0,2 μL , Invitrogen, 11745-100) et de H_2O distillée (2,25 μL). L'ARN cellulaire tat/rev produit par la lignée ACH2 après stimulation est amplifié en parallèle pour confirmer le bon fonctionnement de la PCR (contrôle positif) (Tableaux VI & VII).

Tableau VI. Amorces et sonde tat/rev pour le TILDA du clade AE

Amorces Pré-amplification	Amorces & sonde QPCR
tat1.4AE : 5'-TGG CAG GAA GAA GCG GAA G-3' revAE : 5'-TGT CTC TGY CTT GCT CKC CAC C-3'	tat2AE : 5'-GCA GTA AGG ATC ATC AAA ATC CTA TAC CAG AGC A-3' revAE : 5'-TGT CTC TGY CTT GCT CKC CAC C-3' MSHIVFAMzenAE :56- FAM/TTC YTT CGG/ZEN/GCC TGT CGG GTT CC/3IABkFQ

Tableau VII. Conditions de rétrotranscription et d'amplification de l'ARN épissé

Amplification temps réel	°C	temps
Pré- incubation	95	20 sec
Cycles*45	95	1s
	60	20sec
		1 acquisition

Dans une deuxième étape, une PCR quantitative (QPCR) est réalisée sur le QuantStudio 7 de Thermo Fisher. L'amplification en temps réel se fait dans un volume de 10µL avec 5µL de TaqMan Fast Advanced Master mix, 3,4µL H₂O distillée, 0,2µL de chaque amorce concentrée à 20µM, 0,2µL de sonde MSHIV FAM Zen à 5µM et 1µL du produit pré-amplifié (tableau VIII).

Tableau VIII. Condition d'amplification en temps réel de l'ARN épissé tat/rev

RT et pré-amplification	°C	temps
RT	50	15min
Dénaturation	95	2min
Cycles*24	95	15sec
	60	4min
Conservation	12	-

Finalemt, la fréquence de cellules exprimant de l'ARN viral épissé est calculée selon la loi de Poisson en utilisant le logiciel elda, disponible en ligne : <http://bioinf.wehi.edu.au/software/elda/>. La mesure TILDA a été réalisée sur 83 échantillons stimulés et sur 36 échantillons ex vivo (pas de stimulation). Afin de confirmer que les échantillons indétectables ne produisent pas d'ARN épissés et que cela n'est pas due à un mauvais appariement des amorces, l'ARN viral a également été mesuré dans le surnageant des cultures de stimulation. L'ARN viral est extrait du surnageant de la culture avec le kit QIAamp Viral RNA Mini (cat. 52906), en suivant les indications du fabricant. Par la suite, les échantillons subissent un traitement à la Dnase à l'aide du Dnase kit (Cat. Invitrogen# 18068-015). Finalemt l'ARN viral est mesuré en utilisant une technique publiée précédemment (Vandergeeten et al. Blood 2013). Si l'ARN est détecté dans le surnageant et que le TILDA est indétectable, il est probable que les amorces TILDA n'étaient pas optimales pour ces échantillons et la mesure est exclue de l'analyse.

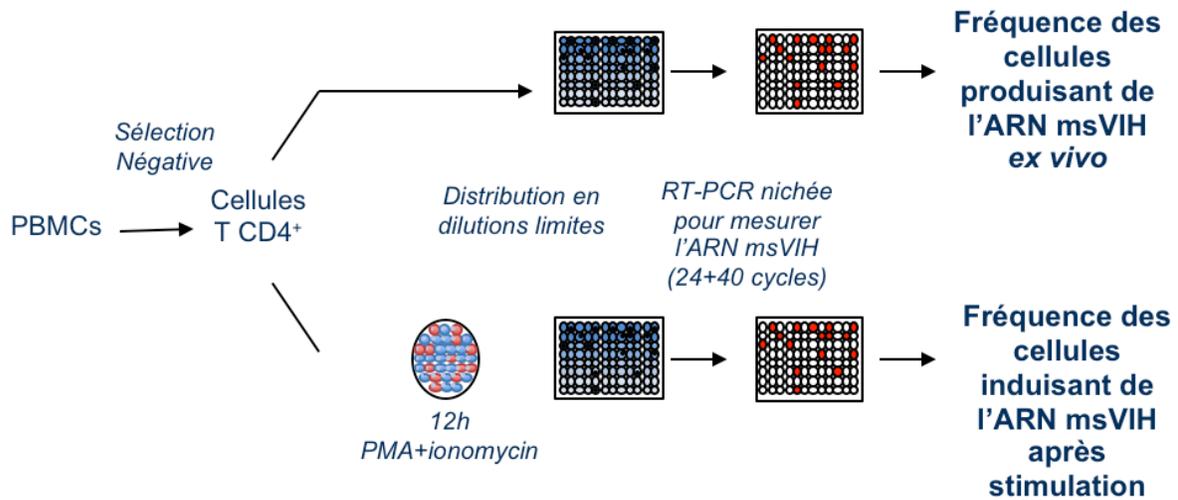


Figure 13. Schéma TILDA

2.4.3 HIV Flow

Cette technique développée récemment dans le laboratoire, permet d'identifier les cellules produisant la protéine virale p24 par cytométrie en flux et de définir leur phénotype (Pardons et al., en préparation). Pour cette étude, la fréquence de cellules produisant la p24 du VIH a été quantifiée *ex vivo* dans les PBMCs de 7 individus en phase aiguë de l'infection et non traités. Des PBMCs sont décongelées et les cellules T CD4⁺ sont enrichies comme détaillé dans la section TILDA. Les cellules sont ensuite transférées dans des tubes de cytométrie de 5mL et resuspendues dans 100µL de PBS avec 2µL de LIVE/DEAD fixable Aqua (cat. Invitrogen#L34957) pour marquer les cellules mortes. Les cellules sont incubées à 4°C pendant 20 min. Par la suite, les cellules T CD4⁺ sont lavées et marquées en surface avec les anticorps suivants : CD3 Alexa Fluor700 (BD 557943), CD4 BUV496 (BD 564651), HLA-DR BUV395 (BD 564040), CD45RA BV786 (BD 563870), CCR7 BB700 (BD 566437), CD27 BV421

(Biolegend 302823) et PD1 BUV737(BD 565299) pendant 30 min à 4°C dans un volume total de 100µL de PBS/HS 4%. Les cellules sont à nouveau lavées et perméabilisées avec 1mL de FoxP3 Fix/Perm buffer pendant 40 min à 4°C. Ensuite, un marquage intracellulaire avec Ki67 FITC (BD 556026), un anticorps contre la protéine virale p24 mature (p24-APC) et un anticorps contre la protéine virales p24 immature (KC57-PE) est réalisé dans 100µL de FoxP3 Perm buffer pendant 45 min à la température de la pièce. Finalement, les cellules sont resuspendues dans 200µL de PBS et analysées sur le cytomètre en flux LSRII (BD Biosciences). Des analyses plus approfondies sont ensuite réalisées sur le programme FlowJo.

2.4.4 Estimation du réservoir total du VIH dans le corps

Le calcul du nombre total de cellules infectées dans le corps selon le stade Fiebig avant et sous traitement est basé sur les quantifications de l'ADN viral intégrée et l'estimation du nombre de lymphocytes T CD4⁺ dans les différentes parties du corps par Ganusov et al.(Ganusov & De Boer, 2007) Les quantifications de l'ADN viral dans les ganglions lymphatiques, les biopsies colon et le sang sont exprimées en copies d'ADN viral par million de cellules. Afin d'exprimer, le nombre de copies du virus par million de cellules T CD4⁺, le pourcentage moyen de cellules T CD4⁺ dans chaque compartiment et à chaque stade de l'infection, obtenu par cytométrie en flux, est utilisé. Le nombre de copies du VIH est déconvolué par million de cellules T CD4⁺ en multipliant le nombre de copie par millions de cellules par le pourcentage moyen de cellules T CD4⁺ correspondant. Par la suite, Ganusov et al. considèrent que les organes lymphoïdes secondaires tel que les ganglions lymphatiques ou les plaques de Payer Patch contiennent au total 115x10⁹ lymphocytes T CD4⁺, les fréquences d'ADN intégré par million de cellules T CD4⁺ dans les ganglions lymphatiques sont multiplié par 115x10³. De même, Ganusov estime

que les muqueuses comme le colon et les poumons contiennent 30×10^9 cellules T CD4⁺, les mesures d'ADN viral déconvoluées dans les biopsies de colon sont multipliées par 30×10^3 . Le sang et la rate produisant les cellules du sang comprennent 20×10^9 lymphocytes T CD4⁺, le même calculé est donc effectué avec ce nombre moyen et les fréquences d'ADN viral calculées dans le sang. Par la suite pour chaque stade Fiebig avant et sous TAR, la médiane, le maximum et le minimum dans les organes lymphoïdes secondaires, les muqueuses et le sang sont quantifiés. Puis à chaque stade les médianes, maximum et minimum de chaque compartiment sont additionnées pour donner une estimation du réservoir total dans le corps.

2.5 Cytométrie en flux

2.5.1 Caractérisation Immunologique

Pour compléter les données virologiques, les niveaux d'activations des cellules T CD4⁺ et CD8⁺ périphériques et les pourcentages des sous-populations des cellules T CD4⁺ sont mesurés chez des individus aux différents stades Fiebig de l'infection avant et après initiation de TAR. Pour cela, des PBMCs de 80 échantillons de personnes infectées non traitées sont décongelées comme mentionné auparavant. Les cellules sont ensuite marquées en surface pour déterminer la fréquence des sous-populations des cellules T CD4⁺ et le niveau d'expression des marqueurs d'activations à la surface des cellules T CD4⁺. Les anticorps suivants sont utilisés : CD3-Alexa700 (BD#557943), CD4-QDot605 (Invitrogen#Q10008), CD8-Pacific Blue (BD#558207), LIVE/DEAD fixable Aqua (Invitrogen#L34957), CD45RA-APC-H7 (BD#560674), CD27-QDot655 (Invitrogen#Q10066), CCR7-PE-Cy7 (BD#557648), HLA-DR-PerCP (BD#347364), CTLA-4-PE (BD#555853). Les cellules sont marquées dans un volume

total de 50µL de PBS/FBS 2% pendant 30 min à 4°C. Les cellules sont resuspendues dans 100µL de FA2% et perméabilisées avec de la saponine 2% pour un marquage intracellulaire de la protéine nucléaire Ki67-FITC (BD#556026), pendant 30 min à 4°C. Finalement les cellules sont analysées par la cytométrie en flux en utilisant un instrument LSRII (BD Biosciences). Des analyses plus approfondies sont ensuite réalisées sur le programme FlowJo. La fréquence des cellules T CD4⁺ mémoires est déterminée comme précédemment décrit dans (Chomont et al., 2009) après exclusion des cellules mortes. Les sous-populations des cellules T CD4⁺ sont définies selon l'expression de CD45RA, CCR7 and CD27: Naïve (T_N: CD45RA⁺,CCR7⁺,CD27⁺), centrale mémoire (T_{CM}: CD45RA⁻,CCR7⁺,CD27⁺), transitionnel mémoire (T_{TM}: CD45RA⁻,CCR7⁻,CD27⁺), effectrice mémoire (T_{EM}: CD45RA⁻,CCR7⁻,CD27⁻) et les cellules en différenciation terminales (T_{TD}: CD45RA⁺,CCR7⁻,CD27⁻). Le marquage est réalisé sur 87 échantillons avant l'initiation du traitement.

2.5.2 Tri cellulaire

Pour déterminer la contribution relative de différents sous types de cellules à l'établissement et à la persistance du VIH, les niveaux d'ADN intégré sont mesurés dans différentes sous-populations de CD4⁺. Après décongélation et enrichissement des cellules T CD4⁺, les sous population des cellules T CD4⁺ sont triées avec le trieur FACS AriaII (BD Biosciences). Les anticorps suivants sont utilisés pour définir les sous-populations mémoires et naïves des cellules T CD4⁺ : CD3-FITC (BD#555339), CD4-APC (BD#340443), CD45RA-APCH7 (BD#560674), CCR7-PE-Cy7 (BD#557648), CD27-PE (BD#555441) et LIVE/DEAD fixable Aqua (Invitrogen#L34957). Les sous-population sont définies comme précédemment (2.5.1). Après tri, des culots secs de chaque sous-population sont réalisés. Finalement, l'ADN intégré est

quantifié dans chaque sous-population T CD4 mémoires et naïves comme précédemment décrit (2.4.1). Le tri est réalisé sur 36 échantillons de personnes non traitées et sur 49 échantillons de personnes sous TAR.

2.6 Statistiques

Toutes les données générées sont analysées sur Graphpad Prism v6.0h. Les quantifications de l'ADN viral ainsi que les valeurs de TILDA sont transformées en logarithme de 10 + 1, soit $\log_{10}([\text{copies de VIH}/10^6 \text{ cellules}] + 1)$, afin que les valeurs nulles soient prises en compte. Dans le sang, les valeurs indétectables pour les PCR ADN ayant une limite de détection plus grande ou égale à 10 copies par millions de PBMCs, reflétant l'analyse de moins de 10^5 de cellules, sont exclues de l'analyse. Dans les tissus, les valeurs ayant une limite de détection plus grande ou égale à 15 copies par millions de cellules sont elles aussi exclues. La distribution normale pour chaque sous-groupe a été déterminée par des tests de Shapiro-Wilk. Dans tous les sous-groupes, les p-values étaient plus petites que 0.05 montrant que les données étaient anormalement distribuées. Ainsi, des tests T de Student non appariés, soit des tests de Mann-Whitney, sont utilisés pour comparer les données avant et sous traitement entre les Fiebig I et les autres stades de l'infection et entre les chroniques et les autres stades de l'infection dans le sang ou les tissus. De plus, les corrélations sont déterminées par des tests non paramétriques de Spearman. Finalement, des ANOVA unidirectionnelles sont utilisées pour comparer les fréquences de cellules infectées entre les différents compartiments et les différentes sous-populations des cellules T CD4⁺. Les p-values de moins de 0.05 sont considérées statistiquement significatives.

Chapitre 3 : Résultats

3.1 Description de la Cohorte

La majorité des personnes infectées sont des hommes (96%) avec une médiane d'âge de 27 ans [IQR 23-33]. La plupart d'entre eux (69%) sont infectés avec les virus de sous-type CRF01-AE, majoritaire en Thaïlande (tableau 8, figure 1). La charge virale mesurée dans le plasma augmente rapidement en phase aigüe de l'infection : elle est très faible au stade Fiebig I avec une médiane de 11732 copies par μL [IQR 4313-46108] et atteint son maximum au stade Fiebig III, avec une médiane de 2656900 copies par μL [IQR 549732-9871790] (table 8, figure 14A). Le compte des cellules T CD4⁺, quant à lui, décroît drastiquement à partir du stade Fiebig III alors qu'inversement le nombre de cellules T CD8⁺ augmente (figure 14B, C), résultant en un ratio CD4/CD8 qui décroît graduellement à partir du stade Fiebig II (tableau IX, figure 14D).

Tableau IX. Données cliniques des participants des cohortes RV254 et RV304

	Aigüe	Fiebig I	Fiebig II	Fiebig III	Fiebig IV/V	Chronique
Age, années médiane [IQR]	27 [23-33]	27 [25-29]	27 [18-53]	28 [22-30]	26 [25-36]	31 [26-36]
Sexe						
homme, n (%)	164 (96)	22 (92)	46 (98)	67 (97)	29 (97)	24 (65)
femme, n (%)	6 (4)	2 (8)	1 (2)	2 (3)	1 (3)	13 (35)
VIH - Clade						
CRF01_AE, n (%)	117 (69)	19 (79)	34 (72)	42 (61)	22 (73)	80 (30)
B, n (%)	4 (2)	0 (0)	2 (4)	1 (1)	1 (3)	0 (0)
Recombinant CRF01_AE/B, n (%)	14 (8)	2 (8)	5 (11)	6 (9)	1 (3)	0 (0)
autre ou indéterminé, n (%)	35 (21)	3 (13)	6 (13)	20 (29)	6 (21)	20 (7)
Temps estimé entre l'exposition au VIH et le recrutement, (jours) médiane [IQR]	18 [14-23]	15 [11-18]	16 [12-23]	19 [15-23]	22 [19-32]	868 [502-2337]
Temps estimé entre l'exposition au VIH et l'initiation de TAR, (jours) médiane [IQR]	19 [14-25]	18 [14-19]	18 [13-25]	20 [15-24]	25 [19-32]	291 [130-410]
Avant ART compte des cellules T CD4, (cells/L) médiane [IQR]	375 [278-504]	556 [431-665]	412 [309-529]	350 [265-463]	289 [214-494]	323 [219-386]
Sous ART compte des cellules T CD4 T, (cells/L) médiane [IQR]	634 [529-802]	602 [560-748]	655 [565-849]	635 [505-780]	588 [468-856]	533 [404-691]
Avant ART compte des cellules T CD8 T, (cells/L) médiane [IQR]	445 [81-4556]	453 [189-2518]	257 [81-1127]	570 [139-3269]	1180 [426-4556]	914 [661-1208]
Sous ART compte des cellules T CD8 T, (cells/L) médiane [IQR]	573 [438-745]	575 [402-761]	509 [422-615]	576 [410-762]	633 [491-767]	698 [548-751]
Avant ART Charge virale dans le plasma, (copies d'ARN viral/mL) médiane [IQR]	680232 [218141-5429036]	11732 [4313-46108]	580357 [253478-2803595]	2656900 [549732-9871790]	788111 [322510-4698648]	57487 [22381-106914]
Sous ART Charge virale dans le plasma, (copies d'ARN viral/mL) médiane [IQR] **	20 [20-50]	20 [20-50]	20 [20-50]	20 [20-50]	20 [20-50]	20 [20-50]
Avant ART						
Quantification du VIH dans le sang, n	107	18	32	43	14	37
Quantification du VIH dans les biopsies du colon, n	70	8	15	35	12	7
Quantification du VIH dans les ganglions lymphatiques, n	30	7	7	10	6	3
Sous ART						
Quantification du VIH dans le sang, n	205	34	59	82	30	41
Quantification du VIH dans les biopsies du colon, n	51	8	15	22	6	7
Quantification du VIH dans les ganglions lymphatiques, n	29	6	6	10	7	5

** Roche Amplicor HIV-1 Monitor Test version 1.5 (Roche Molecular Systems, Inc., Branchburg, NJ, USA) LOD<50
Roche COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan HIV-1 Test v2.0 (Roche Diagnostics, Branchburg, NJ, USA) LOD<20

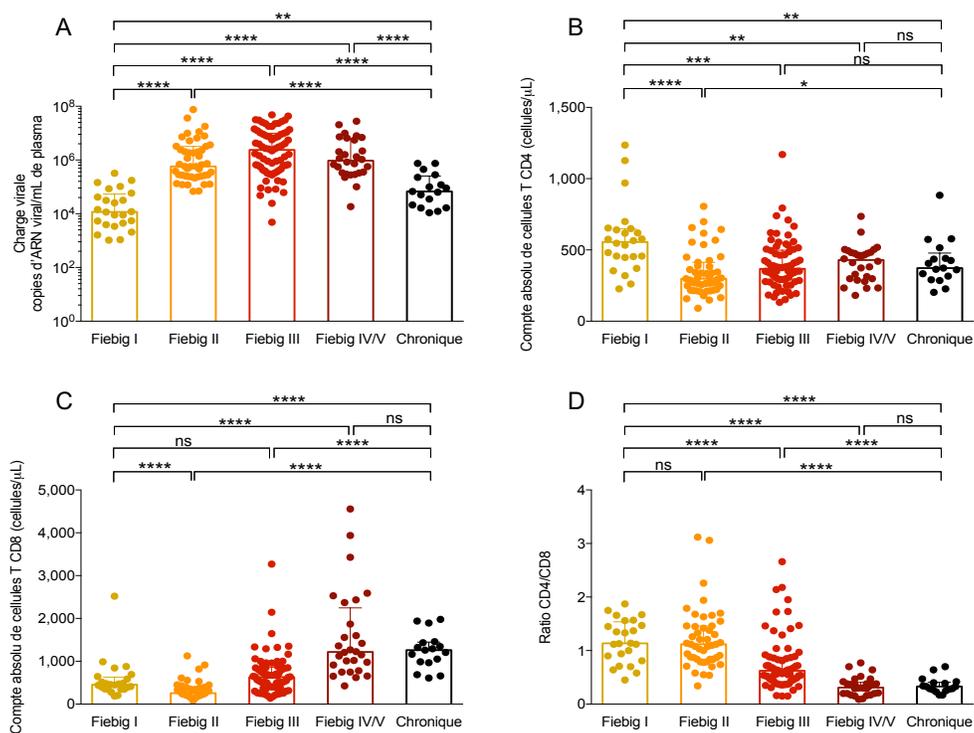


Figure 14. Données cliniques selon le stade Fiebig avant l'initiation de TAR

(A) Charge virale dans le plasma selon le stade Fiebig avant l'initiation de TAR. (B) et (C) Comptes absolus des cellules T CD4⁺ et CD8⁺ respectivement dépendamment du moment d'infection. (D) Ratio CD4/CD8 selon le stade Fiebig avant TAR. Dans (A), (B), (C) et (D) chaque point représente un échantillon avec FI n=24, FII n=47, FIII n=47, FIV/V n=28 et chronique n=17. Les colonnes représentent les médianes avec les écarts interquartiles. Des T tests non paramétriques de Mann Whitney sont réalisés afin de comparer les Fiebig I aux autres stades et les chroniquement infectés aux autres groupes : ns p>0.05, * p<0.05, ** p<0.009, *** p<0.0009, **** p<0.0001.

3.2 Établissement du réservoir du VIH pendant la phase aiguë d'infection

Afin de d'étudier l'établissement du réservoir du VIH au cours de la phase aiguë de l'infection, nous avons mesuré les différentes formes de l'ADN viral : total (mesurant toutes les formes

d'ADN viral intégré ou non), intégré et cercles 2-LTR dans le sang aux différents stades Fiebig. De plus, la fréquence de cellules produisant l'ARN épissé tat/rev a été mesurée par TILDA à chaque stade de l'infection sans stimulation pour évaluer l'évolution de la production virale selon la période de l'infection. Dans un deuxième temps, l'ADN intégré du VIH, étant plus représentatif de la persistance du virus, a été quantifié dans le sang, les ganglions lymphatiques et les biopsies de colon afin d'identifier dans quel compartiment le réservoir du VIH s'établit en premier lieu.

3.2.1 Dynamique de l'établissement du réservoir du VIH dans le sang

L'ADN total du VIH est détectable chez la majorité des personnes au stade Fiebig I de l'infection (13/18). Cependant, chez ces individus, les fréquences de PBMCs avec de l'ADN viral total restent significativement plus basses comparées à tous les autres stades de l'infection (figure 15A). En effet, les fréquences de cellules dans le sang contenant de l'ADN viral total et des cercles 2-LTR augmentent de façon importante dès le stade Fiebig II de l'infection et atteignent leurs maximums au Fiebig III (figure 15A-B). À l'inverse, la fréquence de PBMCs contenant de l'ADN viral intégré suit une cinétique tout à fait différente : Elle augmente graduellement avec le temps d'infection, et atteint son maximum chez les personnes en phase chronique de l'infection (figure 15C). Néanmoins, la mesure de l'ARN tat/rev ex vivo sans stimulation montre que quelques cellules T CD4⁺ produisent de l'ARN viral dans le sang dès le stade Fiebig I, suggérant qu'un petit nombre de cellules T CD4⁺ indétectables au sein des PBMCs (non enrichies en T CD4⁺), ont intégré le virus dès les deux premières semaines d'infection (figure 15D). À partir du stade Fiebig II, la fréquence de ces cellules augmente

significativement en comparaison au stade Fiebig I et atteint des valeurs similaires à celle observée en infection chronique, indiquant une forte production virale tout au long de la phase primaire de l'infection.

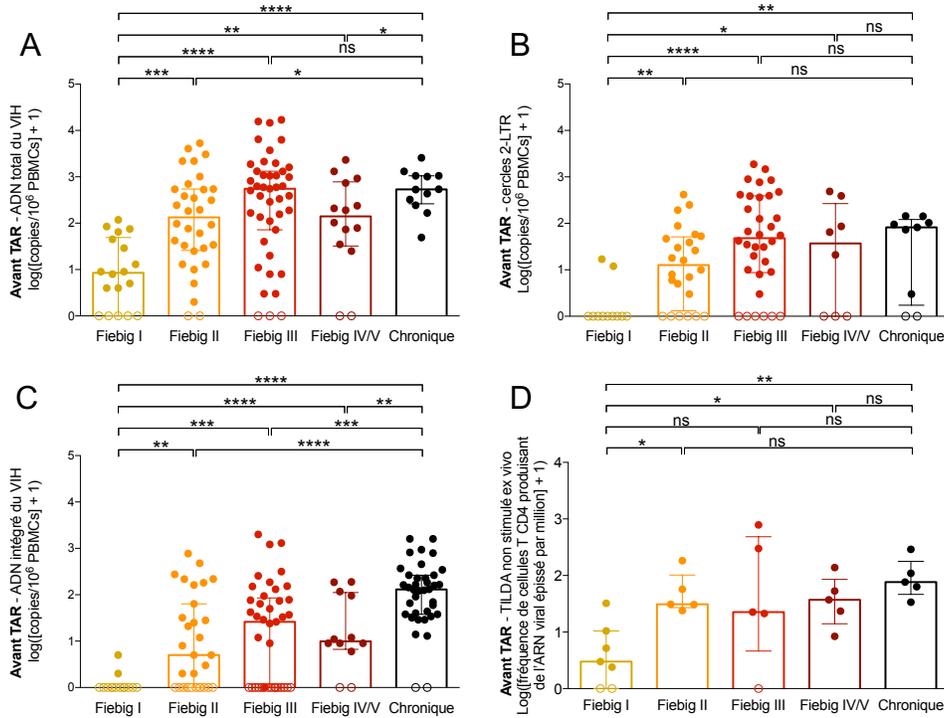


Figure 15. Mesures de l'ADN et de l'ARN viral avant l'initiation de TAR selon le stade de l'infection

(A) Fréquence des PBMCs contenant de l'ADN total du VIH dans le sang selon le stade Fiebig (FI=18, FII=32, FIII=43, FIV/V=14 et chronique=12). (B) Fréquence des PBMCs contenant des cercles 2-LTR dans le sang selon le stade Fiebig (FI= 11, FII= 24, FIII=34, FIV/V=8 et chronique=9). (C) Fréquence des PBMCs contenant de l'ADN intégré du VIH dans le sang selon le stade Fiebig (FI=14, FII=31, FIII=40, FIV/V=12 et chronique=37). (D) Fréquence de cellule T CD4⁺ produisant de l'ARN tat/rev épissé dans le sang selon le stade Fiebig (FI=7, FII=5, FIII=5, FIV/V=5 et chronique=4). Dans (A), (B), (C) et (D), chaque point représente un échantillon et les cercles vides représentent les échantillons indétectables. Les colonnes représentent les médianes avec les écarts interquartiles. Les valeurs sont transformées en $\log_{10}([\text{copies}/10^6 \text{ cellules}] + 1)$. Des T tests non paramétriques de Mann Whitney sont réalisés afin de comparer les Fiebig I aux autres stades et les chroniquement infectés aux autres groupes. ns $p > 0.05$, * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.009$, *** $p \leq 0.0009$, **** $p \leq 0.0001$

Ainsi, chez les personnes au stade Fiebig I de l'infection, seul l'ADN viral total et une faible proportion de cellules produisant de l'ARN viral sont détectables, suggérant que la majorité du virus est non intégré mais que les quelques cellules avec de l'ADN viral intégré sont productivement infectées. Par la suite, la proportion de cellules portant de l'ADN intégré augmente et la production virale s'intensifie. Au cours de l'infection aiguë la majorité de l'ADN viral est non intégré et forme des cercles 2-LTR. En revanche, au stade chronique de l'infection, la fréquence de cellules avec de l'ADN intégré est similaire à celle contenant de l'ADN total (figure 16), suggérant qu'à ce stade la majorité des cellules infectées ont intégré le virus à leur génome.

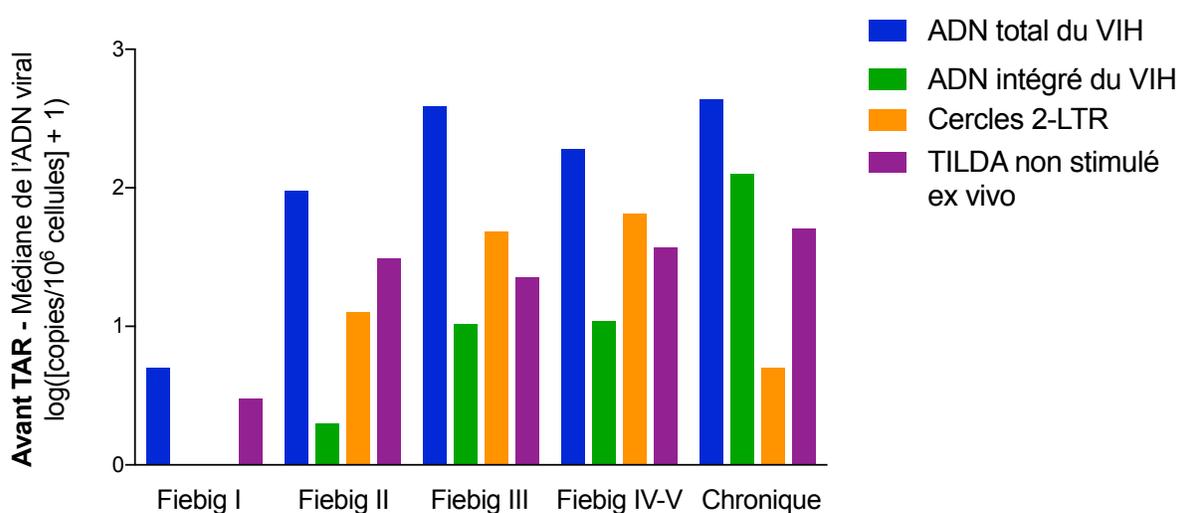


Figure 16. Médianes des différentes mesures de l'ADN et l'ARN viral selon le stade de l'infection

Médianes de l'ADN total, intégré du VIH, des cercles 2-LTR et de la production d'ARN tat/rev pour chaque stade de l'infection. Les valeurs sont transformées en $\log_{10}([\text{copies}/10^6 \text{ cellules}] + 1)$.

En parallèle, dans les mêmes échantillons, le marqueur d'activation et d'épuisement CTLA-4 et le marqueur de prolifération Ki67 sont mesurés par cytométrie en flux au sein des cellules T

CD4⁺. La prolifération des cellules T CD4⁺ augmente au cours de l'infection aiguë marquée par une croissance de l'expression de Ki67 mais cette prolifération diminue drastiquement lors la phase chronique de l'infection (figure 17A). La fréquence de cellules T CD4⁺ exprimant CTLA-4 augmente du stade Fiebig II jusqu'au stade Fiebig IV/V avant de diminuer également au cours de la phase chronique (figure 17B). De plus, les pourcentages de Ki67 et CTLA-4 corrélaient avec les fréquences de l'ADN total et intégré du VIH mesurées avant traitement, suggérant que plus les cellules T CD4⁺ sont actives et prolifèrent, plus le virus se propage et se réplique au sein des cellules T CD4⁺ du sang (figure 17C-F).

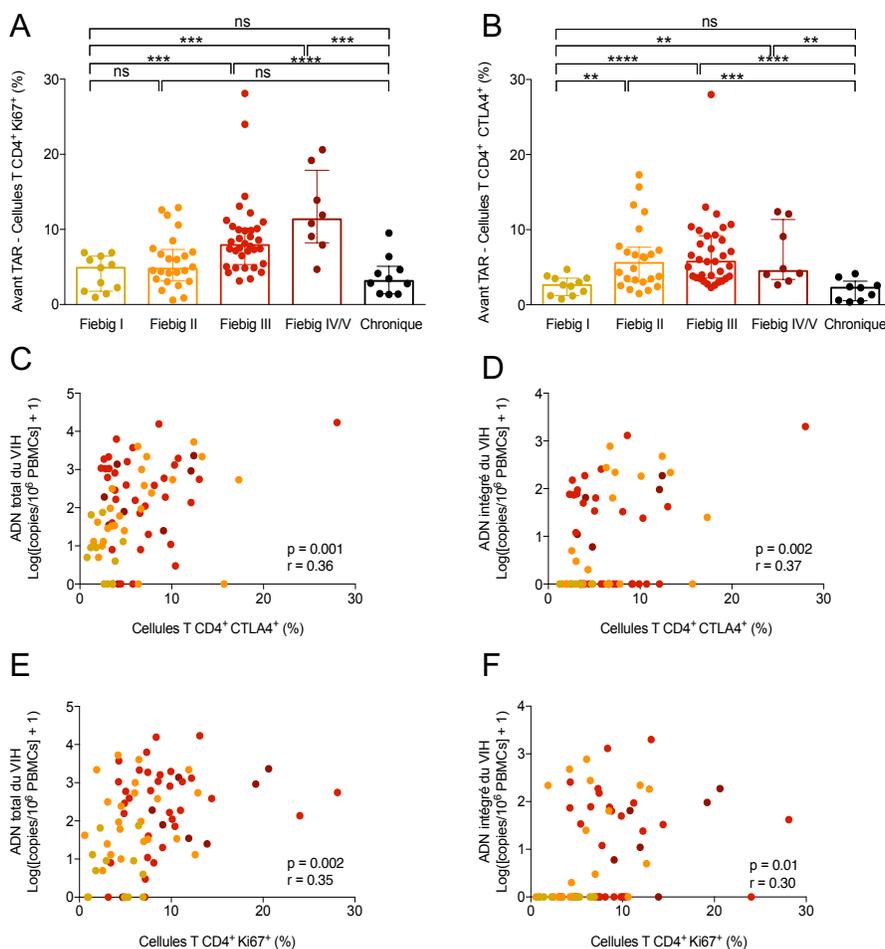


Figure 17. Marqueurs d'activation et de prolifération selon le stade de l'infection avant l'initiation de TAR

(A) Pourcentage des cellules T CD4⁺ exprimant Ki67 selon le stade Fiebig (FI=11, FII=24, FIII=34, FIV/V=8 et chronique=10). (B) Pourcentage des cellules T CD4⁺ exprimant CTLA-4 à leur surface selon le stade Fiebig (FI=11, FII=24, FIII=34, FIV/V=8 et chronique=9). Dans (A) et (B), chaque point représente un échantillon et les colonnes représentent les médianes avec les écarts interquartiles. Des T tests non paramétriques de Mann Whitney sont réalisés afin de comparer les Fiebig I aux autres stades et les chroniquement infectés aux autres groupes. ns p>0.05, * p≤0.05, ** p≤0.009, *** p≤0.0009, **** p≤0.0001. (C) et (D) Corrélation du pourcentage de cellules T CD4⁺ exprimant CTLA4 avec les mesures d'ADN total (C) et intégré (D) du VIH avant l'initiation de TAR. (E) et (F) Corrélation du pourcentage de cellules T CD4⁺ contenant du Ki67 avec les mesures d'ADN total (E) et intégré (F) du VIH avant l'initiation de TAR. Dans (C), (D), (E) et (F) Les valeurs de l'ADN total et intégré du virus sont transformées en log₁₀[(copies/10⁶ cellules)+1] et des tests non paramétriques de Spearman sont utilisés pour déterminer les p-values et le r.

3.2.2 Établissement du réservoir du VIH dans les ganglions

lymphatiques et le colon comparé au sang

Le sang contient peu de lymphocytes T CD4⁺ en comparaison à des tissus comme les ganglions lymphatiques et l'intestin qui sont des compartiments reconnus comme préférentiels pour la persistance du VIH sous traitement (Ganusov & De Boer, 2007; Kulpa & Chomont, 2015; Svicher et al., 2014). Les mesures de l'ADN intégré au sein des ganglions lymphatiques et des biopsies du colon avant initiation de TAR, montrent que la fréquence maximale des LNMCs et des cellules de colons contenant de l'ADN viral intégré est atteint dès le stade Fiebig II de l'infection et se maintient jusque dans l'infection chronique (figure 18A-B). Inversement, comme décrit ci-dessus, la fréquence de PBMCs avec de l'ADN intégré du VIH augmente graduellement au cours de l'infection (figure 18C), suggérant qu'un groupe de cellules infectées s'établit en premier lieu dans les tissus lymphoïdes avant de migrer par la suite dans le sang.

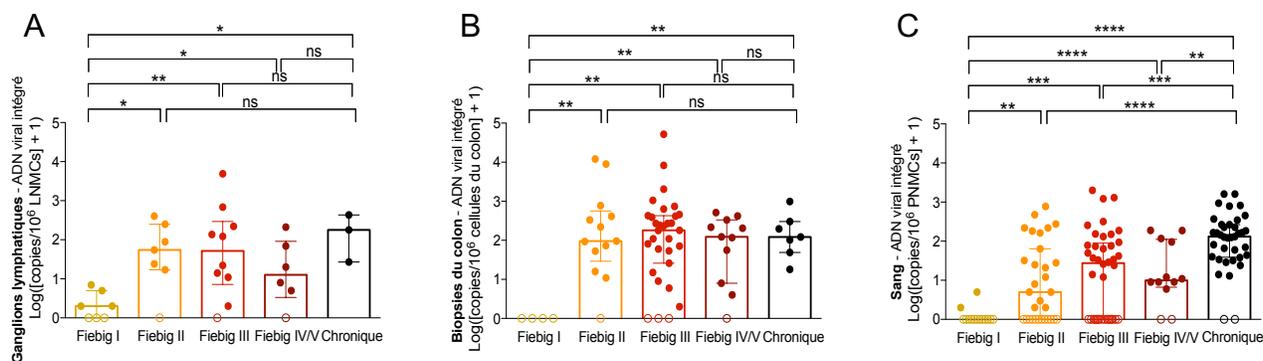


Figure 18. Mesures de l'ADN intégré du VIH dans les ganglions lymphatiques, les biopsies de colon et le sang selon le moment de l'infection avant l'initiation de TAR

(A) Fréquence des LNMCs contenant de l'ADN viral intégré selon le stade Fiebig dans les ganglions lymphatiques (FI=7, FII=7, FIII=10, FIV/V=6 et chronique=3). (B) Fréquence des cellules du colon contenant de l'ADN viral intégré selon le stade Fiebig dans les biopsies du colon (FI=4, FII=13, FIII=31, FIV/V=11 et chronique=7). (C) Fréquence des PBMCs contenant de l'ADN viral intégré selon le stade Fiebig dans le sang (FI=14, FII=31, FIII=40, FIV/V=12 et chronique=37). Dans (A), (B) et (C) chaque point représente un échantillon et les cercles vides représentent les échantillons indétectables. Les colonnes représentent les médianes avec les écarts interquartiles. Les valeurs sont transformées en $\text{log}_{10}([\text{copies}/10^6 \text{ cellules}] + 1)$. Des T tests non paramétriques de Mann Whitney sont réalisés afin de comparer les Fiebig I aux autres stades et les chroniquement infectés aux autres groupes. ns $p > 0.05$, * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.009$, *** $p \leq 0.0009$, **** $p \leq 0.0001$.

En effet, l'ADN viral intégré est détectable dans 81% et 85% des ganglions lymphatiques et des biopsies du colon au cours de la phase aigüe, respectivement. En revanche, seuls 57 % des échantillons de sang présentent des niveaux d'ADN intégré détectables au cours de la phase aigüe de l'infection. En comparaison, presque tous les échantillons des trois compartiments présentent des niveaux détectables au cours de la phase chronique (Figure 19).

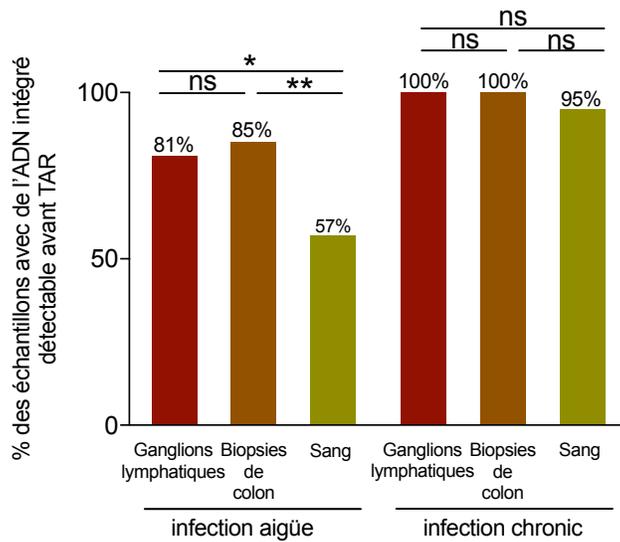


Figure 19. Pourcentage des échantillons avec de l'ADN intégré du virus détectables selon le compartiment avant l'initiation de TAR

Les colonnes représentent le pourcentage des échantillons positifs pour l'ADN intégré du VIH dans les ganglions lymphatiques, les biopsies de colon et le sang au cours de l'infection aiguë et chronique. Des T tests non paramétrique de Mann Whitney sont réalisés afin de comparer les différents compartiments en phase aiguë et chronique de l'infection : ns $p > 0.05$, * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.009$, *** $p \leq 0.0009$, **** $p \leq 0.0001$.

De plus, les fréquences de cellules avec de l'ADN intégré dans les ganglions lymphatiques comme dans les biopsies de colons corrént avec la charge virale, suggérant que les tissus lymphoïdes contribuent à la production de particules virales quantifiées dans le plasma ($p < 0.0001$, $r = 0.68$ and $p = 0.002$, $r = 0.40$ Figure 20 A-B).

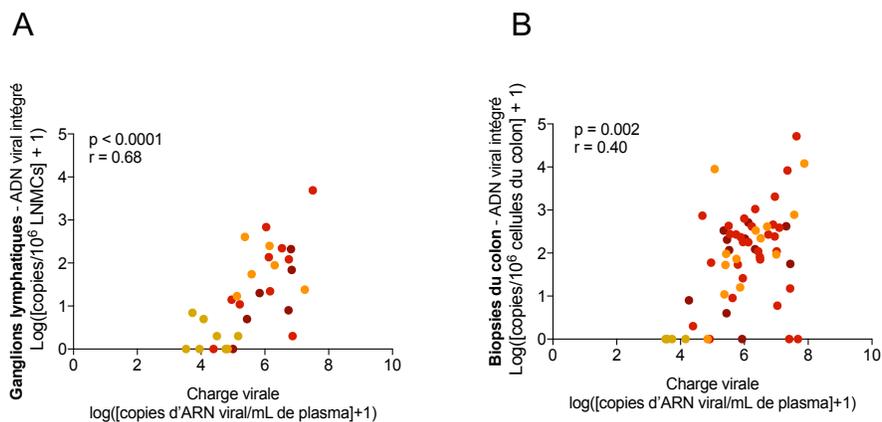


Figure 20. Corrélation entre les mesures d'ADN intégré du VIH dans les ganglions lymphatiques (A) et les biopsies de colon (B) avec la charge virale avant initiation de TAR

Les valeurs sont transformées en $\log_{10}([\text{copies}/10^6 \text{ cellules}] + 1)$ et des tests non paramétriques de Spearman sont utilisés pour déterminer les p-values et le r.

Afin de confirmer cette observation, nous avons calculé les ratios entre l'ADN total et intégré du VIH qui selon (Mexas et al., 2012) reflètent la réplication virale active. Les ganglions lymphatiques présentent un ratio ADN total/intégré significativement plus élevé que le colon ou le sang, indiquant que les sites préférentiels pour la réplication virale pendant la phase primaire de l'infection sont les ganglions lymphatiques (figure 21). Ces résultats suggèrent que la fréquence des cellules productivement infectées atteint son maximum dès le stade Fiebig II de l'infection dans les tissus et que ces cellules participent grandement à la réplication et à la propagation du VIH lors de la phase aigüe de l'infection.

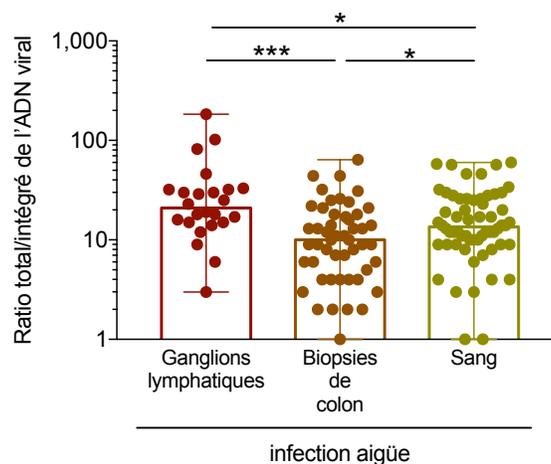


Figure 21. Ratio de l'ADN total et de l'ADN intégré du VIH dans les ganglions lymphatiques, les biopsies du colon et le sang pendant la phase aigüe de l'infection

Le ratio est quantifié pour chaque échantillon et chaque point représente le ratio d'un participant en phase aigüe de l'infection. Les colonnes montrent les médianes avec les écarts interquartiles. Des T tests non paramétriques de Mann Whitney sont réalisés afin de comparer les ratios d'ADN viral total/intégré dans les différents compartiments en phase aigüe de l'infection: ns $p > 0.05$, * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.009$, *** $p \leq 0.0009$, **** $p \leq 0.0001$.

3.3 Impact de l'initiation de TAR en phase aigüe sur la taille du réservoir du VIH

De nombreuses études ont montré que l'initiation précoce de TAR pendant la phase aigüe conduit à un plus petit réservoir du VIH (Archin et al., 2012; Buzon, Martin-Gayo, et al., 2014; Hocqueloux et al., 2013; Strain et al., 2005). Cependant la majorité de ces études ont été réalisées chez des personnes au stade Fiebig III de l'infection ou encore plus tardivement, soit après la séroconversion. Ainsi dans cette deuxième partie nous étudions les effets de l'initiation de TAR aux différents stades Fiebig sur le réservoir du VIH (incluant les stades les plus précoces, Fiebig I et II) et nous mesurons l'impact de l'initiation de TAR en phase aigüe sur la persistance du VIH dans les tissus en comparaison au sang.

3.3.1 Dynamique du réservoir du VIH dans le sang après initiation du traitement en phase aigüe

Afin de déterminer si le moment où TAR est initié a un impact sur les marqueurs de la persistance du VIH, l'ADN total, intégré et les cercles 2-LTR sont mesurés longitudinalement dans le sang de 80 participants ayant initié TAR à différents stades Fiebig. Dès les premières semaines de traitement, les fréquences des cellules avec de l'ADN total, intégré du virus ou les cercles 2-LTR diminuent drastiquement pour les personnes traitées entre le stade Fiebig II et Fiebig IV/V. À l'inverse, TAR a peu d'impact si elle est initiée en phase chronique de l'infection car sur plus de 96 semaines de traitement, les fréquences de cellules avec de l'ADN intégré et des cercles 2-LTR restent similaires aux niveaux d'origine. Une décroissance modeste est

observée dans les fréquences de cellules avec de l'ADN total. Finalement, les personnes traitées au stade Fiebig I ayant déjà des fréquences de cellules infectées basses avant l'initiation de TAR, la décroissance est moins abrupte voire inexistante pour l'ADN intégré où la majorité des échantillons des personnes au stade Fiebig I sont déjà indétectables avant l'initiation du traitement dans le sang (figure 22 A,B,C).

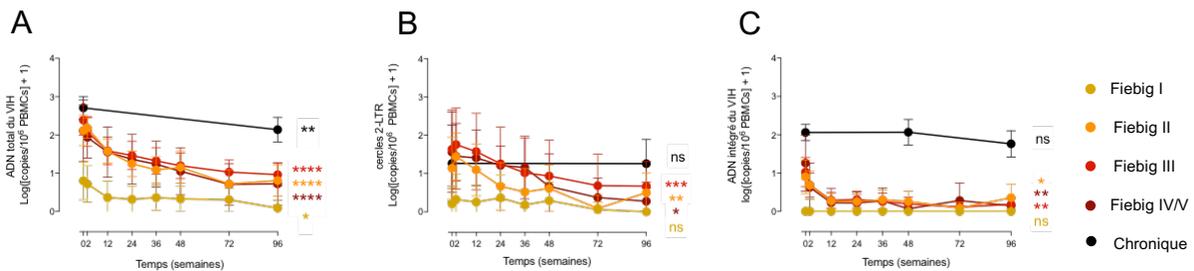


Figure 22. Mesures longitudinales de l'ADN viral sur 96 semaines de TAR dans le sang

Dans (A), (B) et (C), les mesures sont longitudinales chez les participants traités en phase aiguë (N=81, FI=11, FII=27, FIII=34, FIV/V=9) aux semaines 0 avant l'initiation du traitement et 2, 12, 24, 36, 48, 72 et 96 sous TAR. Les mesures chez les personnes traitées pendant la phase chronique sont transversales et sont faites uniquement à la semaine 0 avant initiation de TAR et aux semaines 24 et 96 sous traitement. (A) Fréquence des PBMCs contenant de l'ADN total du VIH. (B) Fréquences des PBMCs contenant des cercles 2-LTR. (C) Fréquence des PBMCs contenant de l'ADN intégré du VIH. Des T tests non paramétrique de Mann Whitney sont réalisés afin de comparer avant (semaine 0) et après 2 ans de traitement (semaine 96) dans les différents groupes: ns $p > 0.05$, * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.009$, *** $p \leq 0.0009$, **** $p \leq 0.0001$.

Après 96 semaines de traitement, les personnes traitées en phase aiguë présentent des fréquences de PBMCs contenant de l'ADN total, intégré et des cercles 2-LTR significativement plus basses que les fréquences mesurées chez les personnes ayant initiées le traitement en phase chronique (figure 23 A,B,C). Néanmoins, les individus traités entre les stades Fiebig II et IV/V ont toujours une faible fréquence de cellules avec de l'ADN total et des cercles 2-LTR alors que chez les

personnes traitées au stade Fiebig I, la majorité des échantillons pour les trois formes d'ADN viral mesurées sont indétectables.

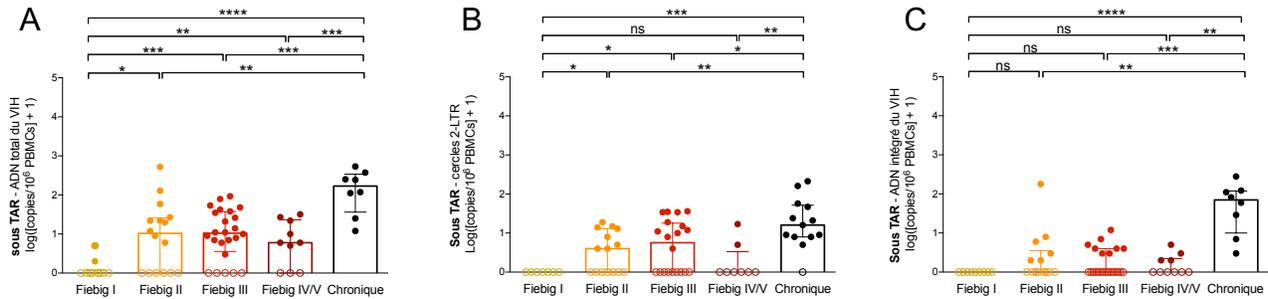


Figure 23. Fréquences des PBMCs avec de l'ADN viral dans le sang après 96 semaines de traitement

(A) Fréquences de PBMCs contenant de l'ADN total du VIH sous TAR selon le moment où le traitement est initié (FI=10, FII=16, FIII=24, FIV/V=10 et chronique=8). (B) Fréquences de PBMCs contenant des cercles 2-LTR sous TAR selon le moment où le traitement est initié (FI=7, FII=15, FIII=20, FIV/V=8 et chronique=13). (C) Fréquences de PBMCs contenant de l'ADN intégré du VIH sous TAR selon le moment où le traitement est initié (FI=9, FII=14, FIII=23, FIV/V=10 et chronique=8). Dans (A), (B) et (C) chaque point représente un échantillon et les cercles ouverts sont les échantillons indétectables. Les colonnes représentent les médianes avec les écarts interquartiles. Les valeurs sont transformées en $\log_{10}([\text{copies}/10^6 \text{ cellules}] + 1)$. Des T tests non paramétriques de Mann Whitney sont réalisés afin de comparer les Fiebig I aux autres stades et les chroniquement infectés aux autres groupes. ns $p > 0.05$, * $p < 0.05$, ** $p < 0.009$, *** $p < 0.0009$, **** $p < 0.0001$.

De façon intéressante, chez les participants ayant commencé le traitement en phase chronique, les mesures de l'ADN total (mesurant à la fois l'ADN viral intégré et non intégré) concordent avec les mesures de l'ADN intégré, alors que la fréquence de PBMCs avec des cercles 2-LTR est bien plus basse. Ceci démontre qu'en phase chronique, avant et après initiation du traitement, la majorité des cellules infectées ont intégré l'ADN viral dans leur génome. À l'inverse, chez les individus traités en phase aiguë les mesures d'ADN total dépassent largement les mesures de l'ADN intégré mais ressemblent aux mesures des cercles 2-LTR, indiquant que l'ADN viral est non intégré dans la majorité des cellules chez les personnes en phase aiguë d'infection. Sur

le long terme (i.e. après des années de TAR), la persistance du VIH est due aux cellules qui ont intégré le virus (Englund, Theodore, Freed, Engelman, & Martin, 1995; Wiskerchen & Muesing, 1995). Ainsi, afin de comparer l'évolution du réservoir du VIH sous TAR chez les participants traités en phase aigüe à celle chez les participants traités en phase chronique, nous avons choisi d'utiliser uniquement la mesure de l'ADN intégré pour la suite des expériences (figure 24).

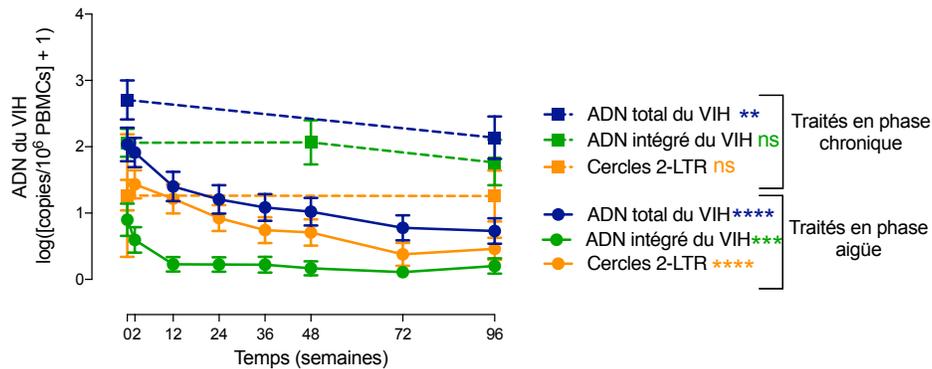


Figure 24. Comparaison des différentes mesures de l'ADN viral entre les personnes traitées en phase aigüe et les personnes traitées en phase chronique dans le sang

Les mesures sont longitudinales chez les participants traités en phase aigüe (cercles) (N=81) aux semaines 0 avant l'initiation du traitement et 2, 12, 24, 36, 48, 72 et 96 sous TAR. Les mesures chez les personnes traitées pendant la phase chronique (carrés) sont transversales et sont faites uniquement à la semaine 0 avant initiation de TAR et aux semaines 24 et 96 sous traitement. Des T tests non paramétrique de Mann Whitney sont réalisés afin de comparer avant (semaine 0) et après 2 ans de traitement (semaine 96) dans les différents groupes: ns $p > 0.05$, * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.009$, *** $p \leq 0.0009$, **** $p \leq 0.0001$.

3.3.2 Réservoir du VIH après six mois à deux ans de traitement dans les tissus comparés au sang

Nous avons montré qu'une grande proportion des échantillons sanguins des personnes traitées pendant la phase aigüe de l'infection présentent des niveaux d'ADN du VIH indétectables après 96 semaines de TAR. Nous avons donc souhaité déterminer si le VIH persiste davantage dans les tissus de ces individus. Nous avons comparé les fréquences des cellules avec de l'ADN

intégré dans le sang avec celles mesurées dans les ganglions lymphatiques et des biopsies de colon, après 24 à 96 semaines de traitement. À l'exception d'une très faible fréquence de PBMCs avec de l'ADN intégré chez une personne à 24 semaine de traitement, l'initiation de TAR au stade Fiebig I conduit à un niveau d'ADN viral intégré indétectable dans le sang comme les tissus. De plus, l'initiation précoce du traitement, soit entre le stade Fiebig II et V, est associée avec une réduction drastique du nombre de cellules portant de l'ADN intégré dans le sang comme dans les ganglions lymphatiques et les biopsies de colon. En comparaison, les personnes ayant initié TAR en phase chronique ont des fréquences de cellules contenant de l'ADN intégré de 1 à 2 fois plus élevées dans les tissus et le sang, respectivement. Contrairement aux biopsies du colon et au sang, la plupart des échantillons de ganglions lymphatiques de personnes traitées entre les stades Fiebig II et IV/V présentent des niveaux détectables (bien que faibles) d'ADN intégré (17/23, figure 25 A,B,C).

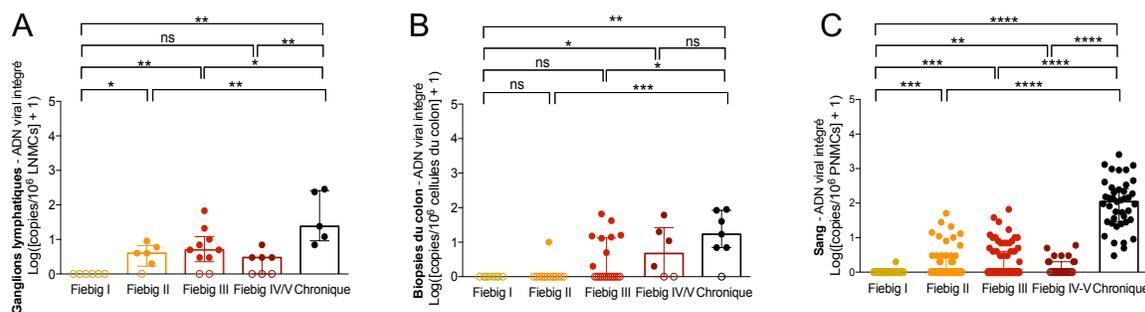


Figure 25. Mesures de l'ADN intégré du VIH dans les ganglions lymphatiques, les biopsies de colon et le sang après 24 à 96 semaines de traitement

(A) Fréquence des LNMCs portant de l'ADN viral intégré selon le stade Fiebig dans les ganglions lymphatiques (FI=6, FII=6, FIII=10, FIV/V=7 et chronique=5). (B) Fréquence des cellules du colon portant de l'ADN viral intégré selon le stade Fiebig dans les biopsies du colon (FI=8, FII=15, FIII=22, FIV/V=6 et chronique=7). (C) Fréquence des PBMCs portant de l'ADN viral intégré selon le stade Fiebig dans le sang (FI=34, FII=59, FIII=82, FIV/V=30 et chronique=41). Dans (A), (B) et (C) chaque point représente un échantillon et les cercles vides représentent les échantillons indétectables. Les colonnes représentent les médianes avec les écarts interquartiles. Les valeurs sont transformées en $\log_{10}([\text{copies}/10^6 \text{ cellules}]+1)$. Des T tests non paramétrique de Mann Whitney

sont réalisés afin de comparer les Fiebig I aux autres stades et les chroniquement infectés aux autres groupes. ns $p > 0.05$, * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.009$, *** $p \leq 0.0009$, **** $p \leq 0.0001$.

En effet, en mesurant la fréquence des cellules avec de l'ADN intégré dans les différents compartiments selon le stade Fiebig où TAR est initié, nous observons que les rares cellules avec de l'ADN intégré persistant sous traitement, après que ce dernier ait été débuté entre le stade Fiebig II et V, se trouvent préférentiellement dans les ganglions lymphatiques et le colon (figure 26 A-E).

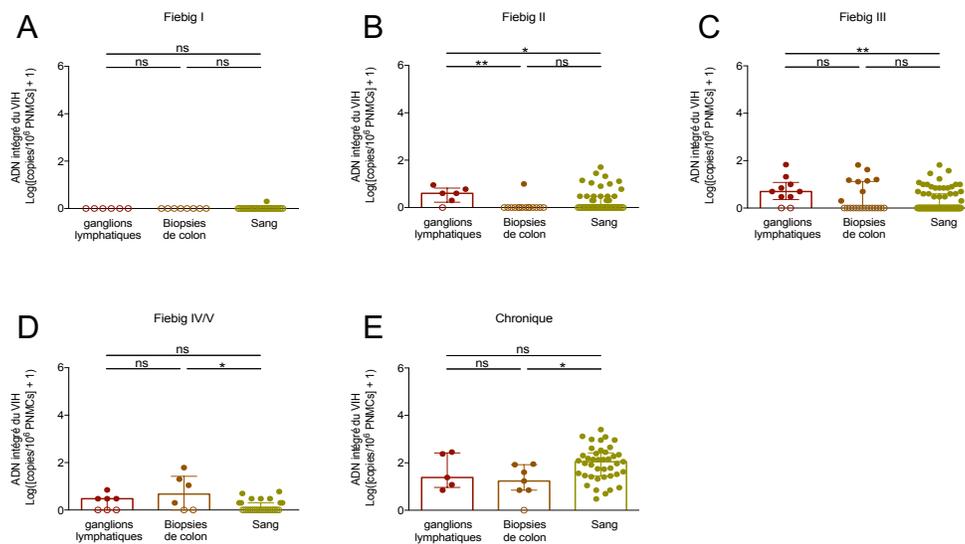


Figure 26. Mesures de l'ADN intégré du VIH dans les ganglions lymphatiques, les biopsies de colon et le sang selon le stade Fiebig où le traitement est initié, après 24 à 96 semaines de traitement

Dans (A), (B), (C), (D) et (E) les fréquences des cellules contenant de l'ADN intégré du VIH selon le moment où TAR est initiée dans les différents compartiments. Chaque point représente un échantillon et les cercles ouverts sont les échantillons indétectables. Les colonnes représentent les médianes avec les écarts interquartiles. Les valeurs sont transformées en $\log_{10}([\text{copies}/10^6 \text{ cellules}] + 1)$. Des T tests non paramétriques de Mann Whitney sont réalisés afin de comparer les tissus au sang : ns $p > 0.05$, * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.009$, *** $p \leq 0.0009$, **** $p \leq 0.0001$. (A) Fiebig I ganglions lymphatiques n=7, biopsies de colon n=4, sang n= 14 (B) Fiebig II ganglions lymphatiques n=7, biopsies de colon n=13, sang n=31 (C) Fiebig III ganglions lymphatiques n=10, biopsies de colon n=31, sang n=40 (D)

Fiebig IV/V ganglions lymphatiques n=6, biopsies de colon n=11, sang n=12 (E) Chronique ganglions lymphatiques n=3, biopsies de colon n=7, sang n=37.

De plus, en utilisant les fréquences des cellules avec de l'ADN viral intégré mesurées dans le sang, les ganglions lymphatiques, les biopsies sigmoïdes du colon et la proportion de cellules T CD4⁺ dans chaque compartiment, nous avons estimé les quantités maximales et minimales de cellules T CD4⁺ infectées dans tout le corps des individus infectés selon le stade de l'infection (figure 27). Avant l'initiation du traitement, les participants traités au stade Fiebig I ont un nombre absolu de cellules infectées plus petit que n'importe quel autre stade de l'infection (entre $0,8 \times 10^6$ - 5×10^6 cellules). Par la suite, le nombre de cellules infectées augmente au stade Fiebig II et III de l'infection (allant jusqu'à 2×10^9 à 1×10^{10} cellules, respectivement), avant de légèrement diminuer au stade Fiebig IV/V et en phase chronique de l'infection (2×10^8 et 5×10^8 cellules, respectivement). Lorsque TAR est commencée en phase chronique de l'infection, le nombre total de cellules infectées est très peu affecté restant entre 4×10^6 à 2×10^8 . À l'inverse, le nombre de cellules infectées dans tout le corps est significativement plus bas chez les personnes traitées en phase aiguë de l'infection (entre $0,1 \times 10^6$ à 4×10^6 , $0,5 \times 10^6$ à 6×10^6 , $0,7 \times 10^6$ à 3×10^7 et $0,8 \times 10^6$ à 9×10^6 au stade Fiebig I, II, III and IV/V, respectivement). Globalement, ces résultats indiquent que sous TAR les fréquences de cellules infectées sont très basses, néanmoins un nombre non négligeable de cellules infectées persistent et sont localisées dans les tissus lymphoïdes.

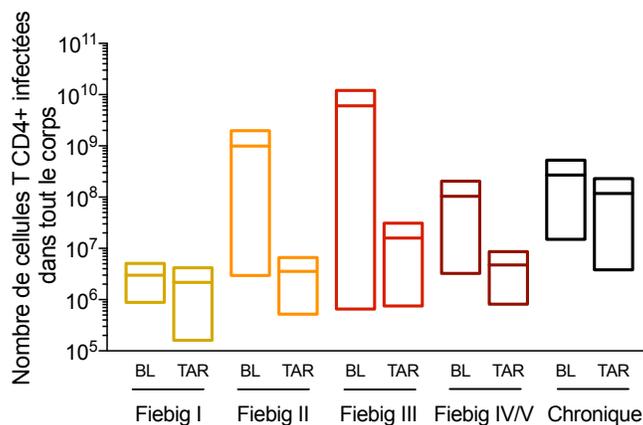


Figure 27. Estimation du nombre total de cellules T CD4⁺ infectées dans tout le corps selon le stade d'infection

Les valeurs maximales et minimales sont représentées pour chaque stade de l'infection à Baseline (BL) et sous TAR. Les barres horizontales représentent les valeurs moyennes pour chaque groupe.

3.3.3 Décroissance du réservoir du VIH selon le compartiment et le moment où TAR est initiée

Les fréquences de cellules infectées dans les tissus des personnes traitées en phase aiguë sont significativement plus faibles que celles quantifiées chez les individus traités en phase chronique. Pourtant, avant l'initiation du traitement, les fréquences des cellules infectées à partir du stade Fiebig II sont similaires aux fréquences mesurées en phase chronique de l'infection. Ces résultats montrent que l'initiation de TAR en phase aiguë a un fort impact sur les cellules contenant de l'ADN intégré et ce même dans les tissus où les antirétroviraux sont connus pour pénétrer moins efficacement en comparaison au sang (figure 28) (Fletcher et al., 2014).

Cependant en comparant la médiane de décroissance, soit le ratio de l'ADN intégré avant et après initiation de TAR dans chaque compartiment, nous notons une décroissance plus importante dans le colon et le sang pour les personnes traitées en phase aiguë. Cette décroissance est notamment très importante dans le sang et le colon des participants ayant commencés le

traitement aux stades Fiebig II et III. En parallèle, une décroissance est notable mais moins importante dans les ganglions lymphatiques (figure 29).

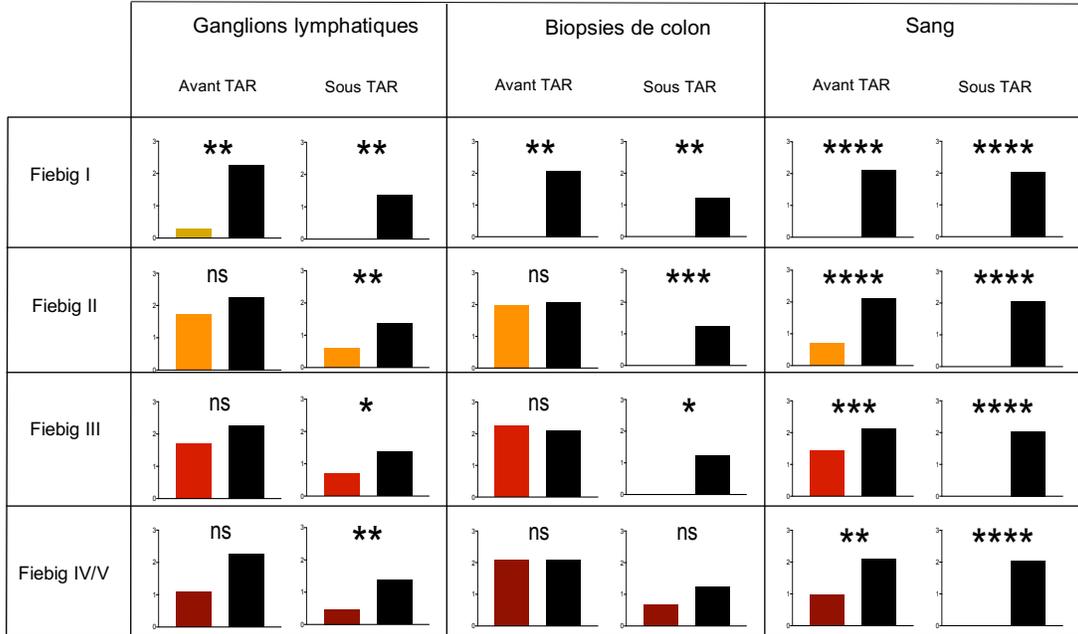


Figure 28. Comparaison des fréquences des cellules avec de l'ADN intégré du VIH avant et sous TAR dans les tissus et le sang, selon le stade Fiebig

La fréquence des cellules avec de l'ADN intégré est comparée entre chaque stade Fiebig (barres colorées) et les individus en phase chronique (barre noire) dans le même compartiment et au même moment. Les colonnes représentent les médianes. Des T tests non paramétriques de Mann Whitney sont réalisés afin de comparer les chroniquement infectés aux autres groupes. ns $p > 0.05$, * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.009$, *** $p \leq 0.0009$, **** $p \leq 0.0001$.

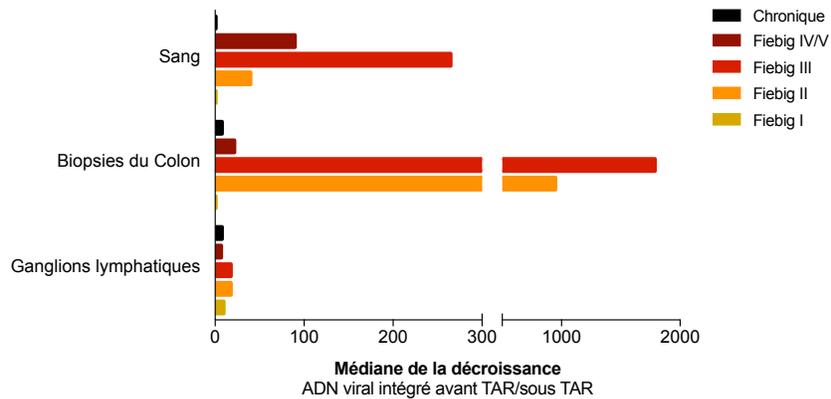


Figure 29. Médiannes de la décroissance des cellules contenant de l'ADN intégré du VIH dans le sang, les biopsies du colon et les ganglions lymphatiques selon le moment où TAR est initiée

Les médianes de la décroissance sont calculées en divisant la médiane de la fréquence des cellules avec de l'ADN viral intégré avant traitement par la médiane de la fréquence des cellules avec de l'ADN viral intégré sous traitement pour chaque stade Fiebig et chaque compartiment.

Finalement, afin d'évaluer l'impact d'une initiation précoce de TAR sur le réservoir du VIH inducible qui est à l'origine du rebond viral lors d'une interruption du traitement, l'ARN tat/rev épissé est mesuré après stimulation dans les cellules T CD4⁺ du sang avant et sous TAR. À l'exception des personnes traitées au stade Fiebig I, les fréquences des cellules produisant de l'ARN viral épissé diminuent significativement après initiation de TAR, quel que soit le moment où le traitement est commencé. Cependant, chez les personnes traitées aux stades Fiebig I, II, et III, l'ARN viral est indétectable dans la majorité des échantillons après 24 à 96 semaines de traitement (FI 5/6, FII 3/5 et FIII 11/ 11 échantillons sont indétectables respectivement). En revanche, chez les individus traités aux stades Fiebig IV/V ou en phase chronique presque tous les échantillons montrent des niveaux d'ARN détectables (FIV/V 4/5 et chronique 11/13 échantillons sont détectables (figure 30A). En effet, la médiane de la décroissance montre que la réduction est très importante lorsque TAR est commencée précocement (FI-III). À l'inverse lorsque le traitement est initié plus tardivement (FIV/V-chronique), cette diminution est très modeste (figure 30B). Dans l'ensemble, ces résultats démontrent que l'initiation d'un traitement précoce limite la taille des réservoirs du VIH dans le sang comme dans les tissus et que la majorité des nombreuses cellules portant de l'ADN intégré dans les tissus en phase aigüe disparaissent si le traitement est initié précocement.

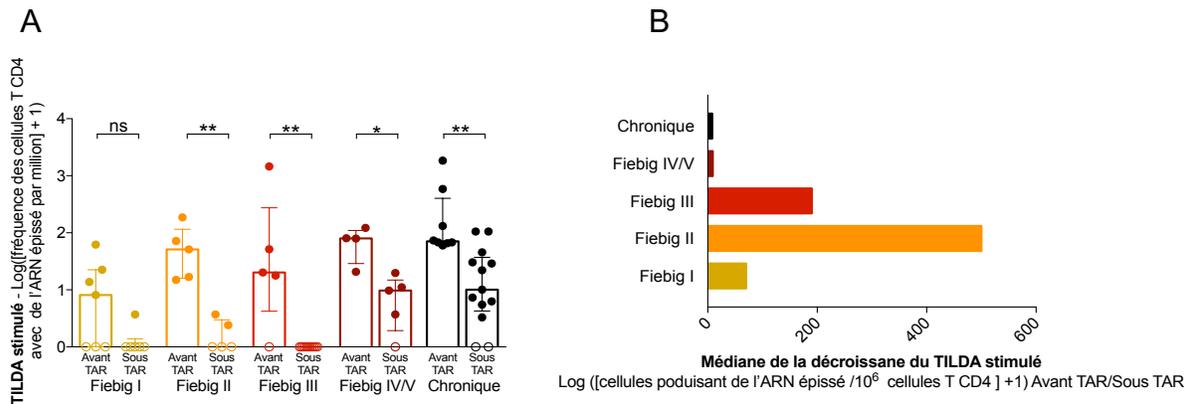


Figure 30. Comparaison entre les fréquences des cellules produisant de l'ARN épissé tat/rev après stimulation avant et sous traitement

(A) Fréquence des cellules T CD4⁺ produisant de l'ARN épissé tat/rev après 12h de stimulation avant et sous traitement selon le stade de l'infection où TAR est initiée (FI avant TAR n=7, sous TAR n=6 ; FII avant TAR n=5, sous TAR n=5 ; FIII avant TAR n=5, sous TAR n=11 ; FIV/V avant TAR n=4, sous TAR n=5 et chronique avant TAR n=8, sous TAR n=13). Chaque point représente un échantillon et les cercles vides représentent les échantillons indétectables. Les colonnes représentent les médianes avec les écarts interquartiles. Les valeurs sont transformées en $\log_{10}([\text{copies}/10^6 \text{ cellules}] + 1)$. Des T tests non paramétriques de Mann Whitney sont réalisés afin de comparer les mesures avant et sous TAR pour chaque stade : ns $p > 0.05$, * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.009$, *** $p \leq 0.0009$, **** $p \leq 0.0001$. (B) Médianes de la décroissance des cellules T CD4⁺ produisant de l'ARN viral épissé après stimulation dans le sang selon le stade Fiebig où TAR est commencée. Les médianes de la décroissance sont quantifiées en divisant les médianes des cellules T CD4⁺ produisant de l'ARN viral épissé après stimulation avant traitement par les médianes des cellules T CD4⁺ produisant de l'ARN viral épissé après stimulation pour un même stade sous TAR.

3.4 Répartition du réservoir du VIH dans les sous-populations des cellules T CD4⁺ dans le sang

Des nombreuses études ont montré que le VIH persiste préférentiellement dans les cellules T CD4⁺ présentant un phénotype mémoire (Chomont et al., 2009). Ainsi, les cellules T CD4⁺

centrales mémoires (T_{CM}), transitionnelles mémoires (T_{TM}) et effectrices mémoires (T_{EM}) ayant une longue demi-vie et persistant dans un état de repos, contribuent grandement à la persistance du VIH sous traitement (Chomont et al., 2009; Douek et al., 2002; Siliciano et al., 2003). À l'inverse, le VIH persiste moins au sein des cellules T $CD4^+$ présentant un phénotype naïf (T_N) sous TAR. Dans cette dernière partie, nous avons trié les différentes sous-populations des cellules T $CD4^+$ dans le sang afin d'identifier les sous-population des cellules T $CD4^+$ dans lesquelles le réservoir du VIH s'établit durant l'infection primaire et au cours de la phase chronique de l'infection. Nous avons également étudié l'impact de l'initiation précoce de TAR sur les fréquences des cellules infectées dans les différentes sous population des cellules T $CD4^+$.

3.4.1 Établissement du réservoir du VIH dans les différentes sous-populations des cellules T $CD4^+$ pendant la phase aiguë d'infection dans le sang

Avant l'initiation du traitement, les personnes au stade Fiebig I de l'infection présentent des fréquences de cellules avec de l'ADN viral intégré plus faibles que tous les autres stades de l'infection, et ce dans toutes les sous-population des cellules T $CD4^+$. Cependant dès le stade Fiebig II, soit environ deux semaines après l'infection, les fréquences de cellules T $CD4^+$ portant de l'ADN intégré du VIH augmentent significativement dans les T_{CM} , T_{TM} et T_{EM} . Dans ces sous-populations, les fréquences maximales des cellules avec de l'ADN intégré du VIH sont atteintes au stade Fiebig III et se maintiennent jusqu'à la phase chronique. Comme attendu, les cellules T $CD4^+$ naïves, exprimant peu de CCR5 et étant donc moins permissives à l'infection, présentent de faibles niveaux d'ADN intégré (figure 31 A,B,C,D).

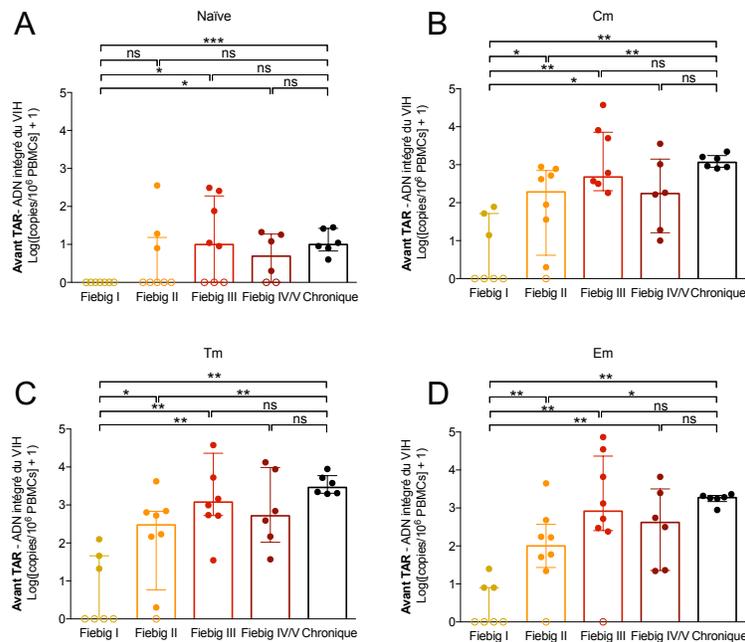


Figure 31. Fréquences des cellules T CD4⁺ portant de l'ADN intégré du VIH dans les différentes sous-populations T CD4⁺ selon le stade de l'infection

Fréquences des cellules (A) T_N (B) T_{CM} (C) T_{TM} et (D) T_{EM} CD4⁺ portant de l'ADN viral intégré dans le sang selon le stade Fiebig de l'infection et avant l'initiation du traitement (FI n=7, FII n=8, FIII n=8, FIV/V n=6 et chronique n=6). Dans (A), (B), (C) et (D) chaque point représente un échantillon et les cercles vides représentent les échantillons indétectables. Les colonnes représentent les médianes avec les écarts interquartiles. Les valeurs sont transformées en log₁₀([copies/10⁶ cellules]+1). Des T tests non paramétriques de Mann Whitney sont réalisés afin de comparer le stade Fiebig I aux autres stades et les chroniquement infectés aux autres groupes. ns p>0.05, * p≤0.05, ** p≤0.009, *** p≤0.0009, **** p≤0.0001.

En termes de contribution de chaque sous population, en moyenne 57 % des cellules infectées présentent un phénotype de T_{TM} en phase aiguë d'infection, contre seulement 23% et 20% pour les T_{CM} et T_{EM}, respectivement. En phase chronique, les T_{TM} demeurent les contributrices majeures avec 48% des cellules portant de l'ADN intégré du VIH. Néanmoins, la contribution des T_{CM} est plus élevée qu'en phase aiguë puisque 37% des cellules avec de l'ADN intégré du VIH présentent ce phénotype (figure 32).

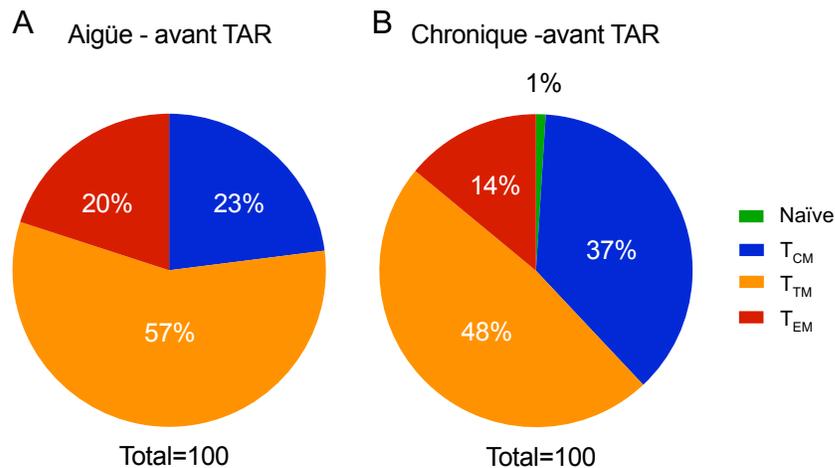


Figure 32. Contribution des cellules avec de l'ADN intégré du VIH pour chaque sous-population T CD4⁺ avant l'initiation du traitement

Ces contributions sont calculées avec la fréquence de chacune des sous-populations de cellules T CD4⁺ pour un participant donné et la fréquence de cellules T CD4⁺ contenant de l'ADN viral intégré dans les différentes sous-populations pour un même participant. Par la suite, les médianes sont extrapolées pour les TN, TCM, TTM et TEM en phase aiguë et en phase chronique respectivement.

Afin d'identifier le phénotype des cellules infectées contribuant à la production des protéines virales au cours de l'infection, nous avons utilisé une nouvelle technique développée dans le laboratoire (M. Pardons et al., en préparation) qui permet de mesurer par cytométrie en flux la protéine virale p24 avec une grande spécificité, ce qui permet de visualiser les cellules productivement infectées. Puisque cette technique utilise la cytométrie en flux, elle permet de phénotyper les cellules produisant la p24 du VIH. Cet essai est utilisé *ex vivo*, c'est-à-dire que le marquage est réalisé après décongélation sans aucun repos, sur des PBMCs de 7 participants en phase aiguë de l'infection entre le stade Fiebig II et IV/V (figure 33). Conformément à nos mesures d'ADN intégré, les résultats montrent que 53.8% des cellules produisant de la p24 présentent un phénotype T_{TM} (bien que les T_{TM} ne représentent que 15.6% de toutes les cellules T CD4⁺). Ces résultats indiquent que pendant la phase aiguë de l'infection, les cellules T_{TM}

contribuent majoritairement au groupe de cellules productivement infectées et que les cellules T_{CM} sont relativement protégées (figure 34).

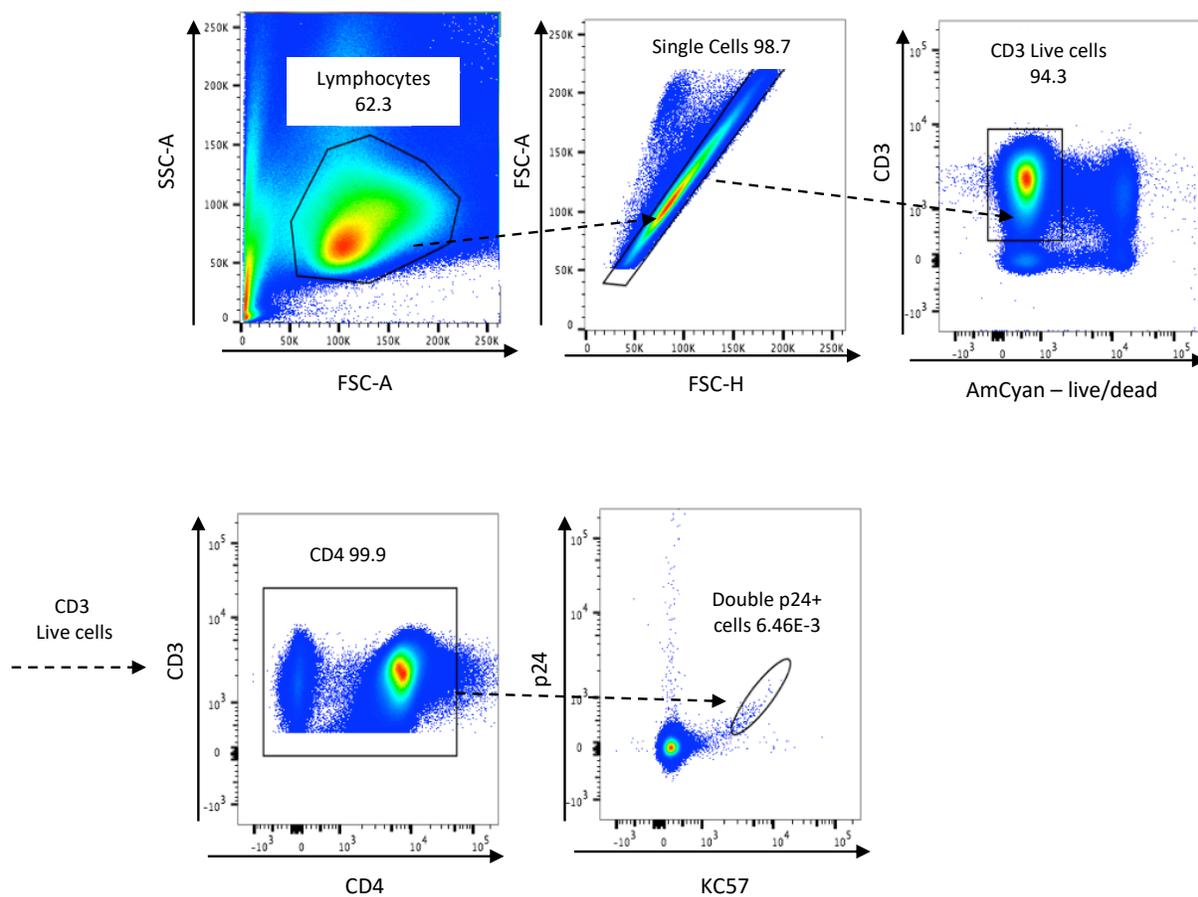


Figure 33. Stratégie de délimitation pour le HIV flow ex vivo

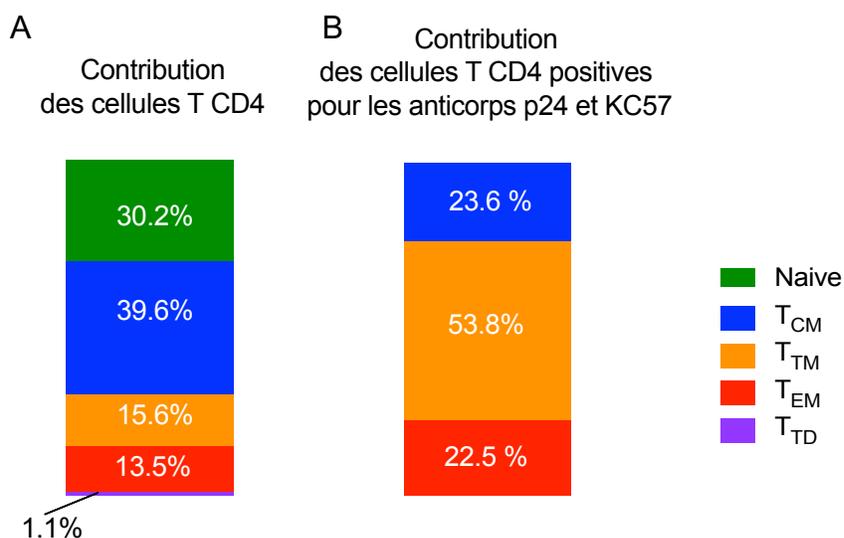


Figure 34. Contribution des cellules produisant de la p24 en phase aigüe de l'infection dans le sang

(A) Médianes des contributions des sous-population T CD4⁺ (B) Médianes des contributions des cellules produisant les protéines virales dans les différentes sous population des cellules T CD4⁺. Pour (A) et (B), la quantification est faite chez 7 participants en phase aigüe de l'infection (FII=2, FIII=3, FIV/V=2)

3.4.2 Impact de l'initiation de TAR en phase aigüe sur la persistance du VIH au sein des sous-populations des cellules T CD4⁺

L'initiation du traitement au stade Fiebig II et III de l'infection entraîne une forte décroissance des fréquences de cellules T CD4⁺ mémoires portant de l'ADN viral intégré (figure 35B, C). En revanche, les fréquences de cellules portant de l'ADN viral intégré dans les T_{CM}, T_{TM} et T_{EM} demeurent similaires chez les personnes traitées au stade Fiebig IV/V ou en phase chronique de l'infection (figure 35D, E). Quant aux participants traités au stade Fiebig I, les fréquences de cellules avec l'ADN intégré du VIH étant déjà très basses dans toutes les sous-populations des cellules T CD4⁺ avant l'initiation du traitement, nous n'avons pas pu mesurer de décroissance

après 24 semaines à 96 semaines de TAR. À noter qu'à l'exception d'un individu qui maintient une faible fréquence de cellules infectées dans les T_{TM}, toutes les autres personnes traitées au stade Fiebig I présentent des niveaux d'ADN intégré indétectables dans toutes les sous-population des cellules T CD4⁺ (figure 35A).

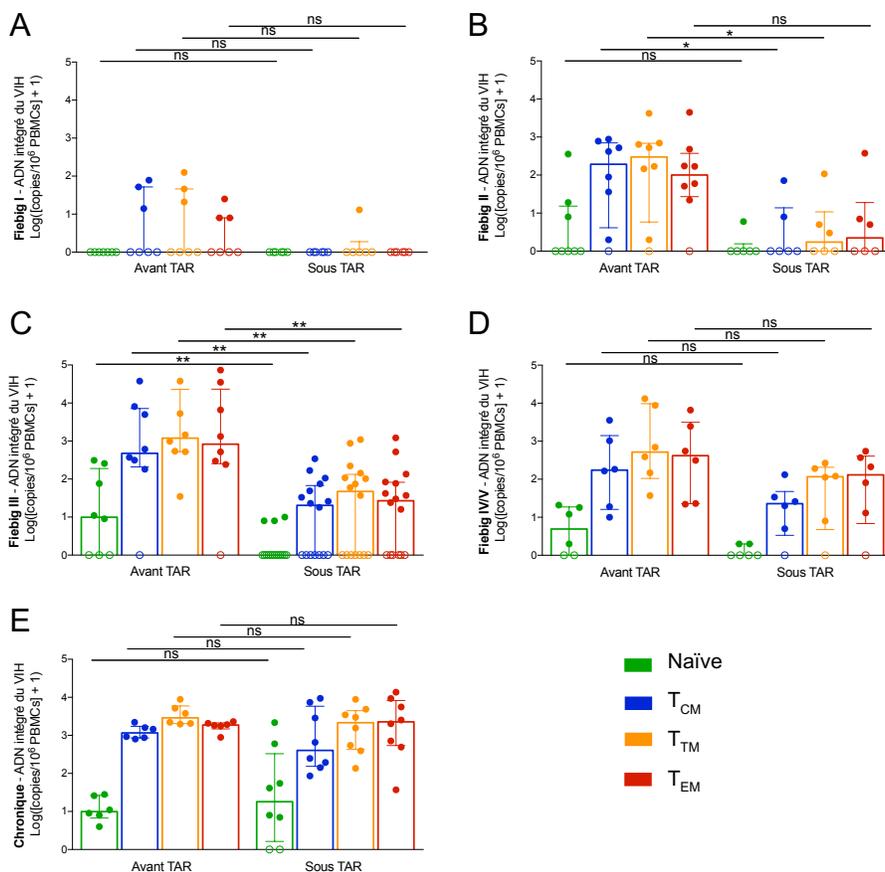


Figure 35. Mesures de l'ADN intégré du VIH dans les différentes sous-populations des cellules T CD4⁺ selon le stade de l'infection en comparant avant et après 24 à 96 semaines de TAR

(A) Fiebig I avant TAR n= 7, sous TAR n=6 (B) Fiebig II avant TAR n= 8, sous TAR n=6 (C) Fiebig III avant TAR n=8, sous TAR n=16 (D) Fiebig IV/V avant TAR n=6, sous TAR n=6 (E) Chronique avant TAR n=6, sous TAR n=8. Dans (A), (B), (C), (D) et (E) chaque point représente un échantillon et les cercles vides représentent les échantillons indétectables. Les colonnes représentent les médianes avec les écarts interquartiles. Les valeurs sont transformées en $\log_{10}([\text{copies}/10^6 \text{ cellules}] + 1)$. Des T tests non paramétriques de Mann Whitney sont réalisés afin

de comparer avant et sous TAR pour chaque stade de l'infection : ns $p > 0.05$, * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.009$, *** $p \leq 0.0009$, **** $p \leq 0.0001$.

En calculant les médianes de décroissance des cellules infectées dans les T_{CM} , T_{TM} et T_{EM} selon le moment où TAR est initiée, nous confirmons que les réductions les plus drastiques sont observées au sein des trois sous-populations mémoires lorsque le traitement est initié au stade Fiebig II et III. La décroissance est beaucoup moins marquée quand TAR est débutée au stade Fiebig IV/V, et elle est inexistante chez les personnes traitées en phase chronique (figure 36).

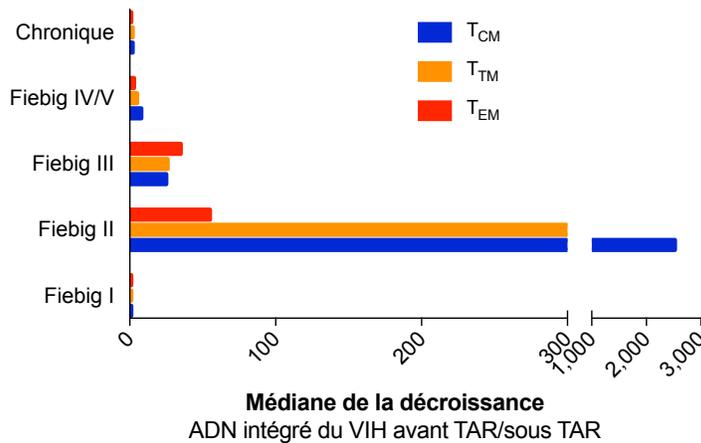


Figure 36. Médianes de la décroissance des cellules contenant de l'ADN intégré du VIH dans les différentes sous-populations des cellules $T CD4^+$ selon le moment où TAR est initiée

Les médianes de la décroissance sont calculées en divisant la médiane de la fréquence des cellules avec de l'ADN viral intégré avant traitement sur la médiane de la fréquence des cellules avec de l'ADN viral intégré sous traitement pour chaque stade Fiebig et dans chaque sous-populations $T CD4^+$.

Globalement, après 24 à 96 semaines de traitement, les cellules avec de l'ADN viral intégré persistent préférentiellement dans les T_{TM} et T_{EM} chez les personnes traitées pendant la phase aiguë de l'infection. En comparaison, chez les personnes traitées en phase chronique de l'infection, le virus persiste dans toutes les sous-populations mémoires de façon équivalentes (figure 37).

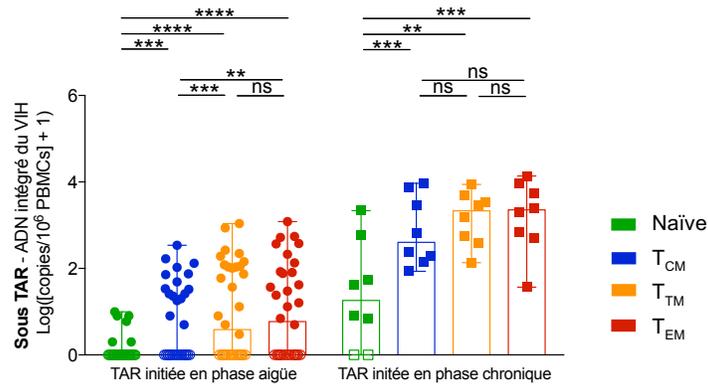


Figure 37. Fréquences des cellules Naïves, T_{CM}, T_{TM}, T_{EM} CD4⁺ contenant de l'ADN viral intégré sous TAR comparant les participants traités en phase aiguë aux participants traités en phase chronique

Chaque point représente un échantillon d'une personne traitée en phase aiguë et chaque carré représente un échantillon d'une personne traitée en phase chronique. Les cercles et carrés vides représentent les échantillons indétectables. Les colonnes représentent les médianes avec les écarts interquartiles. Les valeurs sont transformées en $\log_{10}([\text{copies}/10^6 \text{ cellules}] + 1)$. Une ANOVA unidirectionnelle est utilisée pour comparer les différentes sous-populations de cellules T CD4 : ns $p > 0.05$, * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.009$, *** $p \leq 0.0009$, **** $p \leq 0.0001$.

Finalement, le calcul des contributions des différentes sous-populations chez les personnes traitées en phase aiguë ou chronique montrent que le contributeur majeur des cellules infectées persistant sous TAR sont les T_{TM} pour les individus traités en phase aiguë de l'infection. À l'inverse, le contributeur majeur chez les personnes traitées en phase chronique sont les T_{CM}. Ces résultats suggèrent que si le traitement est commencé précocement au cours de l'infection, les cellules T_{CM} sont relativement préservées de l'infection et contribuent moins au réservoir persistant.

Dans son ensemble, cette dernière partie montre que même si des hautes fréquences de cellules T CD4⁺ mémoires avec de l'ADN intégré sont mesurées dès le stade Fiebig II, une initiation précoce du traitement diminue drastiquement le nombre de cellules T CD4⁺ mémoires infectées.

Le faible nombre de cellules infectées qui persistent présentent majoritairement un phénotype de T_{TM} (figure 38).

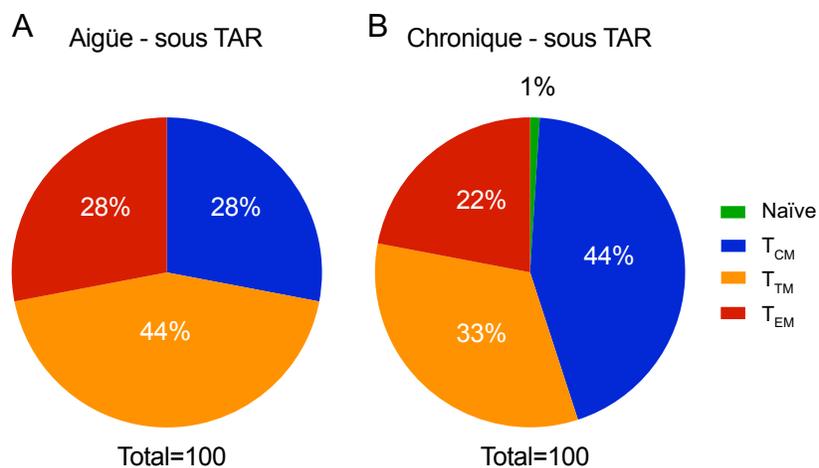


Figure 38. Contribution des cellules avec de l'ADN intégré du VIH pour chaque sous-population $T CD4^+$ après 24 à 96 semaines de TAR

Ces contributions sont calculées avec la fréquence de chacune des sous-populations de cellules $T CD4^+$ pour un participant donné et la fréquence de cellules $T CD4^+$ contenant de l'ADN viral intégré dans les différentes sous-populations pour un même participant. Par la suite, les médianes sont extrapolées pour les T_N , T_{CM} , T_{TM} et T_{EM} des individus traités phase aigüe ou en phase chronique, respectivement.

Chapitre 4 : Discussion

4.1 Établissement précoce du réservoir du VIH durant la phase aigüe de l'infection

La majorité des études portant sur l'établissement des réservoir viraux au cours de la phase aigüe de l'infection ont été réalisées chez les primates non-humain (PNH) (Kumar, Chahroudi, & Silvestri, 2016; Okoye et al., 2018; Whitney et al., 2014). En effet, chez les PNH, il est plus facile de contrôler l'infection (voie, dose, temps) et de mesurer le réservoir du SIV à un moment précis de l'infection. À l'inverse, chez l'homme il est beaucoup plus difficile d'identifier une personne en phase aigüe d'infection et d'estimer sa date d'infection de manière précise. L'étude RV254/SEARCH 010, de par son protocole d'enrôlement de personnes en phase aigüe de l'infection efficace et de par la grande participation des personnes infectées, nous donne l'opportunité unique d'étudier pour la première fois l'établissement et la persistance du réservoir du VIH en phase aigüe au sein des tissus et des sous-population des cellules T CD4⁺.

4.1.1 Les mesures de l'ARN et de l'ADN viral montrent une intégration précoce du virus

Le premier objectif de mon projet était d'étudier la dynamique de l'établissement du réservoir du VIH pendant la phase aigüe de l'infection. Les mesures de l'ADN intégré montrent que dès le stade Fiebig II, soit avant la séroconversion, une faible fréquence de cellules du sang contient de l'ADN intégré. Pour les individus au stade Fiebig I, soit moins de deux semaines après l'infection présumée, seul deux participants sur quatorze ont montré des niveaux détectables d'ADN intégré dans le sang. Cependant, la détection par TILDA d'ARN épissé dans des cellules T CD4⁺ du sang des participants au stade Fiebig I suggère qu'un petit nombre de cellules, non

déTECTABLES au sein des PBMCs par manque d'enrichissement pour les cellules T CD4⁺, ont intégré le virus permettant la production d'ARN épissé. Ces observations montrent qu'avant même la séroconversion, un faible nombre de PBMCs ont intégré le génome viral, ce qui est en accord avec l'étude de l'infection aiguë chez les PNH dans laquelle l'ADN proviral est identifié dans le sang 3 jours seulement après infection (Whitney et al., 2014). Néanmoins, comparativement aux mesures de l'ADN total (quantifiant tout ADN viral, qu'il soit intégré ou non) et des cercles 2-LTR qui atteignent leurs fréquences maximales dès le stade Fiebig II, les fréquences des PBMCs portant de l'ADN intégré sont beaucoup plus faibles, et augmentent graduellement pendant l'infection primaire avant d'atteindre leur maximum en phase chronique. Ainsi, en phase aiguë la majorité du virus est non intégré alors qu'en phase chronique la situation est inversée, et les fréquences des cellules portant de l'ADN total sont similaires à celles portant de l'ADN intégré. Globalement, ces résultats indiquent que le virus s'intègre extrêmement tôt dans un petit nombre de cellules du sang. Toutefois, en phase aiguë de l'infection la majorité du virus reste non intégré comparé aux individus en phase chronique de l'infection.

4.1.2 L'activation des cellules T facilite l'établissement du réservoir du VIH

Les mesures du marqueur d'activation et d'épuisement CTLA-4 et du marqueur de prolifération Ki67 montrent une augmentation de la fréquence de ces marqueurs à la surface des cellules T CD4⁺ du sang pendant la phase aiguë de l'infection, avant de diminuer en phase chronique. De plus, les pourcentages de CTLA-4 et Ki67 corrélaient avec les mesures d'ADN total et intégré au cours de la phase aiguë. Ces observations montrent qu'au cours de la progression de l'infection pendant la phase aiguë, les cellules T CD4⁺ sont davantage activées et prolifèrent abondamment. Ainsi, l'activation des cellules T CD4⁺ favorise l'infection productive des cellules T CD4⁺

responsables de la dissémination virale (Chavez, Calvanese, & Verdin, 2015). Néanmoins cette sur-activation des cellules T CD4⁺ peut aussi mener à un épuisement du système immunitaire et à l'élimination d'un grand nombre de cellules T CD4⁺ infectées ou non (Deeks et al., 2004; Streeck & Nixon, 2010). Ainsi, cet épuisement du système immunitaire nuit à la persistance des cellules infectées. Nos résultats suggèrent qu'en phase aiguë de l'infection, seul un petit nombre de cellules portant l'ADN intégré persiste. À l'inverse, en phase chronique, l'activation de cellules T CD4⁺ diminuant, un plus grand nombre de cellules avec de l'ADN intégré persiste.

4.1.3 Les réservoirs du VIH s'établissent en premier lieu au sein des tissus lymphoïdes

La majorité des études du réservoir sont effectuées avec des échantillons sanguins car ils sont plus faciles d'accès. Cependant, seul 2% des lymphocytes T sont localisés dans le sang (Ganusov & De Boer, 2007). À l'inverse, les tissus lymphoïdes ont une forte concentration de cellules T CD4⁺ et forment un sanctuaire pour les cellules T CD4⁺ infectées (Perreau et al., 2013; Sathaliyawala et al., 2013). Ainsi afin de comprendre l'établissement du VIH en phase aiguë, il est important de mesurer la fréquence de cellules infectées dans les tissus lymphoïdes.

Nos observations indiquent qu'en phase aiguë de l'infection, les cellules portant de l'ADN intégré sont préférentiellement localisées dans les ganglions lymphatiques et le colon, ce qui est en accord avec les résultats observés dans l'étude des primates non-humain par (Whitney et al., 2014). Dès le stade Fiebig II, la fréquence maximale des cellules portant de l'ADN intégré du VIH dans les ganglions lymphatiques et le colon est atteinte et se maintient jusqu'à la phase chronique. À l'inverse, dans le sang, la fréquence des PBMCs portant de l'ADN intégré augmente graduellement jusqu'à la phase chronique. Ainsi nos résultats indiquent clairement

que les cellules des tissus lymphoïdes sont infectées en premier lieu. Ces résultats peuvent en partie s'expliquer par le fait que au cours de la réponse du système immunitaire inné en phase primaire de l'infection, les cellules dendritiques infectées migrent rapidement du site d'infection vers les tissus lymphoïdes permettant une dissémination rapide du virus au sein de ces tissus (L. Wu & KewalRamani, 2006).

En plus d'avoir une haute fréquence de cellules infectées, la mesure d'un ratio ADN total/ADN intégré élevé dans les ganglions lymphatiques reflète une forte production virale dans ces tissus (Mexas et al., 2012). Cette observation est renforcée par les corrélations significativement positives entre les mesures de l'ADN intégré dans les tissus et la charge virale plasmatique. Ainsi, ces résultats vont dans le même sens que l'étude de Perreau et al. identifiant les cellules folliculaires T (Tfh) résidant dans les tissus lymphoïdes comme la source principale de la production virale tout au long de l'infection (Perreau et al., 2013). Ceci suggère que les tissus lymphoïdes sont la source majoritaire des cellules infectées au cours de la phase aiguë de l'infection et ils permettent une forte production virale qui amène par la suite à la circulation et à l'accumulation de cellules infectées dans le sang.

4.2 L'initiation précoce de TAR en phase aiguë de l'infection influence la taille du réservoir du VIH

De nombreuses études ont montré que l'initiation précoce de la thérapie antirétrovirale réduit la taille du réservoir du VIH (Buzon, Martin-Gayo, et al., 2014; Buzon et al., 2010; Hocqueloux et al., 2013; Strain et al., 2005). Ainsi, le deuxième objectif du projet était d'évaluer l'impact de TAR selon le moment de la phase aigüe où elle est initiée. En effet, les études précédentes sur la phase aigüe de l'infection ont généralement été effectuées chez des participants au stade Fiebig III et après de l'infection du VIH (Hocqueloux et al., 2010; Lodi et al., 2012; Saez-Cirion et al., 2013; Salgado et al., 2011)

4.2.1 Décroissance du réservoir du VIH lorsque TAR est initiée en phase aigüe

Une forte décroissance des fréquences de cellules portant de l'ADN viral intégré est observée en phase aigüe, ce qui est en accord avec les études précédemment effectuées (Buzon, Martin-Gayo, et al., 2014; Hocqueloux et al., 2013; Strain et al., 2005). Notamment, lorsque TAR est commencée au stade Fiebig I-III de l'infection, la décroissance est encore plus marquée, ce qui conduit à des fréquences de cellules contenant de l'ADN viral intégré extrêmement basses. De plus, la décroissance n'a pas seulement lieu dans le sang, elle est aussi notable dans les tissus lymphoïdes où avant l'initiation du traitement les fréquences de cellules infectées étaient similaires à celles observées chez les personnes en phase chronique. En comparaison, lorsque TAR est initiée en phase chronique de l'infection, les fréquences de cellules portant de l'ADN intégré du VIH ne diminuent que très modestement. De plus, les individus traités en phase chronique maintiennent des hautes fréquences de cellules infectées et ce dans tous les compartiments et après 6 mois à 2 ans de traitement.

La décroissance du réservoir du VIH lorsque TAR est initiée précocement peut être expliquée par le fait qu'en phase aiguë de l'infection les cellules sont productivement infectées. Ainsi ces cellules T CD4⁺ très activées à ce stade forment probablement un réservoir du VIH plus instable. À l'inverse, en phase chronique de l'infection les cellules sont moins activées et forment un réservoir plus stable au sein de cellules T CD4⁺ quiescentes. De plus, à partir de la phase chronique de l'infection le VIH a grandement muté afin d'échapper au système immunitaire ce qui fait qu'une grande portion des cellules avec de l'ADN viral intégré contiennent un virus défectif à ce stade. Ainsi lorsque le traitement est initié en phase chronique une large portion des génomes intégrés des participants sont latents ou défectifs, ils sont donc moins prônes à l'élimination. En effet, des études précédentes ont montré que les cellules productivement infectées ont une durée de vie courte (≈ 2 jours)(D. D. Ho et al., 1995; Wei et al., 1995) alors que les cellules T CD4⁺ infectées latentes ont une demi-vie de 42 mois (Crooks et al., 2015; Siliciano et al., 2003).

De plus, l'étude récente de Takata et al., réalisée sur des échantillons issus de la même cohorte, a récemment montré que pendant une courte période très tôt dans la phase aiguë de l'infection les cellules T CD8⁺ spécifiques au VIH sont capables de diminuer le nombre de cellules productivement infectées (Takata et al., 2017). L'initiation précoce du traitement accompagné d'une réponse CTL efficace peuvent expliquer la décroissance importante du nombre de cellules infectées entre les stades Fiebig II et III. À l'inverse, aux stades Fiebig IV et chronique de l'infection, l'émergence d'une réponse CTL dysfonctionnelle empêche l'élimination des cellules infectées et contribue à la stabilité des cellules infectées lorsque TAR est initiée.

4.2.2 Les cellules infectées persistent sous TAR sont préférentiellement localisées dans les tissus lymphoïdes

Lorsque TAR est commencée précocement entre les stades Fiebig I et III, après 6 mois à 2 ans de traitement, les niveaux de cellules contenant de l'ADN viral intégré sont généralement indétectables dans le sang et le colon. Néanmoins, chez 5/6 participants traités au stade Fiebig II et 8/10 traités au stade Fiebig III, nous avons mesuré des faibles fréquences de cellules infectées dans les ganglions lymphatiques. Les ganglions lymphatiques sont reconnus comme un site préférentiel pour la persistance du VIH sous TAR. En effet, malgré une réponse efficace des cellules T CD8⁺ cytotoxiques pendant la phase aigüe de l'infection, ces cellules ne peuvent pas pénétrer dans les centres germinatifs des ganglions lymphatiques pour éliminer les cellules T CD4⁺ folliculaires infectées. Ainsi, ces centres germinatifs peuvent servir de sanctuaire pour la persistance d'un petit nombre de cellules infectées sous TAR. (Fukazawa et al., 2015; Sathaliyawala et al., 2013).

4.3 Établissement et persistance du VIH en phase aigüe dans les sous-populations des cellules T CD4⁺ du sang

Les mesures de l'ADN intégré dans les différentes sous-populations mémoires des cellules T CD4⁺ du sang ont largement confirmé nos observations faites dans les cellules non triées de tissus et du sang. En effet, dès le stade Fiebig II de l'infection, les fréquences de cellules

contenant de l'ADN viral intégré doublent comparativement au stade Fiebig I dans toutes les sous-populations mémoires des cellules T CD4⁺. Au stade Fiebig III, la fréquence maximale des cellules infectées est atteinte dans les T_{CM}, T_{TM} et T_{EM} et perdurent jusqu'à la phase chronique de l'infection. Néanmoins, lorsque TAR est initiée entre les stades Fiebig I et III, la décroissance du nombre de cellules T CD4⁺ mémoires avec de l'ADN intégré est marquée alors que si le traitement est commencé aux stades Fiebig IV/V ou plus tard la décroissance est beaucoup plus modeste. Ainsi, comme dans les cellules des tissus et du sang, les cellules T CD4⁺ présentant un phénotype mémoire en phase aiguë de l'infection forment un réservoir du VIH instable qui ne persiste pas avec l'initiation de TAR. Une autre observation intéressante est que la contribution des sous-populations est différente entre la phase aiguë et la phase chronique de l'infection. En effet, en phase aiguë de l'infection les cellules infectées présentent majoritairement un phénotype de T_{TM} alors qu'en phase chronique les T_{TM} et T_{CM} contribuent de façon égale au groupe de cellules infectées. Lorsque le traitement est initié en phase aiguë de l'infection, le peu de cellules infectées persistantes ont majoritairement un phénotype T_{TM} alors que si TAR est initiée en phase chronique les cellules infectées qui persistent ont en grande partie un phénotype de T_{CM}. Ainsi, ces résultats suggèrent qu'en phase aiguë les cellules T_{TM} sont infectées en premier lieu et les T_{CM} sont partiellement protégées de l'infection. Ces résultats concordent avec les observations de Chéret A et al. et Buzon et al. montrant que l'initiation précoce de TAR protège l'infection des cellules T CD4⁺ T_{CM} et que sous TAR les cellules infectées persistantes ont un phénotype de T_{EM} et T_{TM} majoritairement (Cheret et al., 2015) (Buzon, Martin-Gayo, et al., 2014). Ces observations peuvent être expliquées par le fait que les cellules T_{TM} sont plus facilement activables que les cellules T_{CM}, ainsi ces T_{TM}, activées sont une meilleure cible pour le virus au cours de l'infection aiguë. Il en va de même pour les cellules

T_{EM} qui elles aussi peuvent être facilement activées néanmoins elles ont une plus faible fréquence et contribuent moins au réservoir du VIH en comparaison au T_{TM} et T_{CM} qui sont-elles présentes en plus grand nombre.

4.4 Un traitement très précoce est-il suffisant pour contrôler le virus ?

L'identification de cellules avec de l'ADN intégré dans le sang et les tissus des participants au stade Fiebig I est extrêmement rare, que ce soit avant ou après traitement. De même, lorsque les sous-populations des cellules T CD4⁺ des personnes au stade Fiebig I de l'infection sont triées, la grande majorité des échantillons présentent des niveaux indétectables d'ADN intégré. Néanmoins, dans le cadre d'une étude récente à laquelle nous avons participé (Colby et al., 2018) nous avons observé un rebond viral rapide suite à une interruption de traitement chez 8 participants qui avaient initié TAR au stade Fiebig I et suivi un traitement pendant une médiane de 2,8 ans. Ainsi, bien que l'ADN viral ne soit souvent pas détecté chez ces personnes traitées dans les deux premières semaines de l'infection, une initiation précoce de TAR ne semble pas être suffisante pour permettre le contrôle du virus post-interruption. En effet, en utilisant les valeurs d'ADN mesurées dans les quelques échantillons de sang, de biopsies de colon et de ganglions lymphatiques positifs de personnes au stade Fiebig I de l'infection, nous avons estimé que la taille totale du réservoir du VIH dans le corps d'une personne au stade Fiebig I de l'infection est comprise entre $0,8 \times 10^6$ et 5×10^6 cellules infectées. Bien que ce nombre de cellules infectées soit conséquent, il reste toutefois 500 à 2000 fois plus faible que le réservoir total estimé chez les personnes en phase chronique de l'infection. Sous traitement, les individus ayant

commencé TAR au stade Fiebig I de l'infection ont un réservoir total du VIH entre $0,1 \times 10^6$ et 4×10^6 cellules infectées, ce qui reste encore un fois entre 40 et 200 fois plus petit que lorsque TAR est initiée en phase chronique de l'infection. Globalement, ces résultats et l'étude de Colby et al. (Colby et al., 2018) montrent qu'un petit groupe de cellules contenant de l'ADN intégré du VIH s'établit dès les premiers stades de l'infection et, malgré l'initiation précoce de TAR qui diminue la taille du réservoir, une partie des cellules infectées est capable de produire du virus persiste.

Dans certains cas lorsque le traitement est initié en phase aiguë de l'infection, les personnes arrivent à contrôler le virus suite à une interruption de TAR, comme dans la cohorte VISCONTI (Saez-Cirion et al., 2013) et l'étude SPARTAC (Lehmann, Wyen, & Fatkenheuer, 2013). Néanmoins, beaucoup d'études ont montré que l'initiation précoce du traitement n'était pas suffisante par elle-même pour permettre un contrôle de la virémie post-interruption (Colby et al., 2018; Fidler et al., 2013; Giacomet et al., 2014). Ainsi, il faut donc recourir à des stratégies additionnelles pour réduire ou empêcher l'établissement précoce du réservoir du VIH ce qui est en accord avec les observations récentes dans le modèle NHP (Borducchi et al., 2016). De plus, l'équipe de Hill et al. suggère qu'une réduction d'environ 2000 fois du nombre de cellules infectées est nécessaire afin de permettre à la majorité des personnes infectées d'interrompre TAR pendant 1 an sans rebond viral (Hill, Rosenbloom, Fu, Nowak, & Siliciano, 2014). En combinant nos estimations et les observations de Hill et al., nous estimons qu'il faudrait réduire la taille du réservoir du VIH d'un facteur supplémentaire de 3 à 60 fois afin d'observer un contrôle du virus après l'interruption de TAR chez les personnes traitées au stade Fiebig I.

4.5 Limitation statistique

La manière dont la majorité des figures sont représentées montre toujours les mesures aux différents stades Fiebig et chez les personnes en phase chronique d'infection. Par la suite, les Fiebig I étant des cas très rares avec moins de deux semaines d'infection où seul l'ARN viral est détectable, ils sont comparés aux autres groupes et les chroniques sevrant de contrôles sont aussi comparés aux différents stades Fiebig. Cette représentation de plusieurs groupes induit l'utilisation de tests ANOVA de Kruskal-Wallis non paramétriques et de tests T non-paramétriques de Dunn qui corrigent les p-values par le nombre de groupe en multipliant les p-values par le nombre de groupe comparés. Néanmoins tout le long de l'étude, les Fiebig I ou les participants en phase chroniques sont toujours comparés à un autre stade Fiebig ou entre eux, induisant l'utilisation d'un test T non-paramétrique de Mann-Whitney. Ainsi des tests non-paramétriques de Mann Withney qui est un test par rang beaucoup plus conservateur d'un T test de Student ont été utilisés pour les statistiques. L'utilisation de ce test a toutefois des limitations car il ne tient pas compte du nombre de groupe. Les deux types de tests ont été réalisées sur la figure 18 et trois des quinze comparaisons significatives avec le test de Mann-Whitney deviennent non significatives avec un test de Dunn (données non présentées). Cette différence peut être expliquée par le fait que dans certains groupes le nombre de patient est très limité ainsi la significativité peut rapidement changer selon le test utilisé. Tout le long de notre analyse, nous avons pris en compte que certains de nos résultats n'étaient que des tendances et amènent seulement à des suggestions. Des études additionnelles devront donc être effectuées pour confirmer ces suggestions.

Chapitre 5 : Conclusion

En conclusion, le but de ce projet était d'identifier la localisation et le moment où le réservoir du VIH s'établit au cours de la phase aiguë de l'infection et d'étudier l'impact de l'initiation de TAR à différents moments de la phase aiguë d'infection sur la taille du réservoir du VIH.

Nous avons montré que le réservoir du VIH s'établit dès les deux premières semaines de l'infection et avant la séroconversion dans les tissus lymphoïdes tel que les ganglions lymphatiques et le colon. Très vite les tissus lymphoïdes sont saturés en cellules infectées et participent grandement à la production de nouveaux virions qui recirculent et infectent les PBMCs du sang. À partir du pic viral soit après le stade Fiebig III de l'infection, la fréquence de cellules infectées est équivalente dans le sang comme dans les tissus.

Lorsque TAR est initiée suffisamment tôt au cours de l'infection aiguë, soit entre le stade Fiebig I-III, il y a une décroissance drastique des fréquences de cellules infectées dans tous les compartiments, amenant à des fréquences de cellules infectées très basses voir presque indétectables. À l'inverse, si le traitement est commencé plus tardivement dans l'infection, soit le stade Fiebig IV/V et la phase chronique, la décroissance du nombre de cellules infectées est très modeste et après deux ans de traitement les fréquences de cellules avec de l'ADN intégré restent similaires dans le sang comme dans les tissus.

Ainsi, même si l'initiation précoce du traitement permet réduire la taille du réservoir du VIH, un petit nombre de cellules infectées répliquatives compétentes persistent dans les ganglions lymphatiques empêchant le contrôle de la virémie lorsque le traitement est interrompu. Ainsi,

une initiation de TAR en phase aigüe de l'infection a un impact non négligeable sur la taille du réservoir du VIH mais ne suffit pas en elle-même pour permettre le contrôle du virus.

Néanmoins, une étude récente chez les primates non-humain par Nishimura et al. (Nishimura et al., 2017), a montré que l'injection d'une combinaison de deux anticorps neutralisants contre le VIH (bNAbs) trois jours après l'infection une fois par semaine pendant trois semaines, permettait un contrôle du virus pendant près de 177 jours après la dernière injection. À l'inverse, l'initiation précoce de TAR après trois jours d'infection n'était pas suffisante et menait à un rebond viral assez rapidement. Une étude future pour la cohorte RV254 pourrait être de combiner l'initiation précoce du traitement avec une série d'injections d'une combinaison d'anticorps neutralisants contre le VIH afin d'éliminer un maximum des cellules infectées dans les premières semaines de l'infection et d'éventuellement mener à un contrôle de la virémie après interruption de TAR chez ces individus. Une autre possibilité est l'utilisation de anticorps $\alpha 4\beta 7$ en combinaison avec une initiation en phase aigüe de l'infection de TAR. En effet, les anti- $\alpha 4\beta 7$ comme la drogue Vedolizumab déjà couramment utilisée pour traiter les maladies inflammatoires de l'intestin, empêchent l'entrée des cellules immunitaires dans les tissus de l'intestin. Dans le contexte de l'infection du VIH, les tissus gastro-intestinaux sont les compartiments touchés en premier lieu par une intense réplication virale et une rapide déplétion des cellules T CD4. En 2016, Byrareddy et al. (Byrareddy et al., 2016) ont montré que chez les macaques l'initiation de TAR en complément avec une série d'infusion d'anti- $\alpha 4\beta 7$ pendant 30 semaines permettait le contrôle du SIV après l'interruption de TAR et de l'anticorps $\alpha 4\beta 7$. Dans le contexte de l'initiation précoce du traitement il serait intéressant de rajouter des infusions de Vedolizumab et d'étudier les possibilités d'un contrôle de la virémie après l'interruption de TAR

et des infusions chez les participants. En conclusion, une combinaison entre différentes drogues menant à une réponse immunitaire plus efficace ou empêchant la migration des cellules immunitaire sur le site de l'infection et une initiation précoce du traitement pourrait être clé pour réaliser une cure fonctionnelle contre le VIH.

Bibliographie

- An, P., & Winkler, C. A. (2010). Host genes associated with HIV/AIDS: advances in gene discovery. *Trends Genet*, *26*(3), 119-131. doi:10.1016/j.tig.2010.01.002
- Ananworanich, J., Chomont, N., Eller, L. A., Kroon, E., Tovanabutra, S., Bose, M., . . . Robb, M. L. (2016). HIV DNA Set Point is Rapidly Established in Acute HIV Infection and Dramatically Reduced by Early ART. *EBioMedicine*, *11*, 68-72. doi:10.1016/j.ebiom.2016.07.024
- Ananworanich, J., Schuetz, A., Vandergeeten, C., Sereti, I., de Souza, M., Rerknimitr, R., . . . Kim, J. H. (2012). Impact of multi-targeted antiretroviral treatment on gut T cell depletion and HIV reservoir seeding during acute HIV infection. *PLoS One*, *7*(3), e33948. doi:10.1371/journal.pone.0033948
- Archin, N. M., Vaidya, N. K., Kuruc, J. D., Liberty, A. L., Wiegand, A., Kearney, M. F., . . . Perelson, A. S. (2012). Immediate antiviral therapy appears to restrict resting CD4+ cell HIV-1 infection without accelerating the decay of latent infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *109*(24), 9523-9528. doi:10.1073/pnas.1120248109
- Arts, E. J., & Hazuda, D. J. (2012). HIV-1 Antiretroviral Drug Therapy. *Cold Spring Harb Perspect Med*, *2*(4), a007161. doi:10.1101/cshperspect.a007161
- Avert. (2017). HIV Stigma and Discrimination. Retrieved from <https://www.avert.org/professionals/hiv-social-issues/stigma-discrimination>
- Barre-Sinoussi, F., Chermann, J. C., Rey, F., Nugeyre, M. T., Chamaret, S., Gruest, J., . . . Montagnier, L. (1983). Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science*, *220*(4599), 868-871.
- Barre-Sinoussi, F., Ross, A. L., & Delfraissy, J. F. (2013). Past, present and future: 30 years of HIV research. *Nat Rev Microbiol*, *11*(12), 877-883. doi:10.1038/nrmicro3132
- Baxter, A. E., Niessl, J., Fromentin, R., Richard, J., Porichis, F., Massanella, M., . . . Kaufmann, D. E. (2017). Multiparametric characterization of rare HIV-infected cells using an RNA-flow FISH technique. *Nat Protoc*, *12*(10), 2029-2049. doi:10.1038/nprot.2017.079
- Blanche, S., Rouzioux, C., Moscato, M. L., Veber, F., Mayaux, M. J., Jacomet, C., . . . et al. (1989). A prospective study of infants born to women seropositive for human immunodeficiency virus type 1. HIV Infection in Newborns French Collaborative Study Group. *N Engl J Med*, *320*(25), 1643-1648. doi:10.1056/nejm198906223202502
- Borducchi, E. N., Cabral, C., Stephenson, K. E., Liu, J., Abbink, P., Ng'ang'a, D., . . . Barouch, D. H. (2016). Ad26/MVA therapeutic vaccination with TLR7 stimulation in SIV-infected rhesus monkeys. *Nature*, *540*(7632), 284-287. doi:10.1038/nature20583
- Brodt, H. R., Kamps, B. S., Gute, P., Knupp, B., Staszewski, S., & Helm, E. B. (1997). Changing incidence of AIDS-defining illnesses in the era of antiretroviral combination therapy. *Aids*, *11*(14), 1731-1738.
- Bruner, K. M., Hosmane, N. N., & Siliciano, R. F. (2015). Towards an HIV-1 cure: measuring the latent reservoir. *Trends Microbiol*, *23*(4), 192-203. doi:10.1016/j.tim.2015.01.013

- Bruner, K. M., Murray, A. J., Pollack, R. A., Soliman, M. G., Laskey, S. B., Capoferri, A. A., . . . Siliciano, R. F. (2016). Defective proviruses rapidly accumulate during acute HIV-1 infection. *Nat Med*, 22(9), 1043-1049. doi:10.1038/nm.4156
- Butler, S. L., Hansen, M. S. T., & Bushman, F. D. (2001). A quantitative assay for HIV DNA integration in vivo. *Nat Med*, 7, 631. doi:10.1038/87979
- Buzon, M. J., Martin-Gayo, E., Pereyra, F., Ouyang, Z., Sun, H., Li, J. Z., . . . Lichterfeld, M. (2014). Long-term antiretroviral treatment initiated at primary HIV-1 infection affects the size, composition, and decay kinetics of the reservoir of HIV-1-infected CD4 T cells. *J Virol*, 88(17), 10056-10065. doi:10.1128/jvi.01046-14
- Buzon, M. J., Massanella, M., Llibre, J. M., Esteve, A., Dahl, V., Puertas, M. C., . . . Martinez-Picado, J. (2010). HIV-1 replication and immune dynamics are affected by raltegravir intensification of HAART-suppressed subjects. *Nat Med*, 16(4), 460-465. doi:10.1038/nm.2111
- Buzon, M. J., Sun, H., Li, C., Shaw, A., Seiss, K., Ouyang, Z., . . . Lichterfeld, M. (2014). HIV-1 persistence in CD4+ T cells with stem cell-like properties. *Nat Med*, 20(2), 139-142. doi:10.1038/nm.3445
- Byrareddy, S. N., Arthos, J., Cicala, C., Villinger, F., Ortiz, K. T., Little, D., . . . Ansari, A. A. (2016). Sustained virologic control in SIV+ macaques after antiretroviral and alpha4beta7 antibody therapy. *Science*, 354(6309), 197-202. doi:10.1126/science.aag1276
- CDC, C. f. D. C. (1981). Kaposi's sarcoma and Pneumocystis pneumonia among homosexual men--New York City and California. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, 30(25), 305-308.
- CDC, C. f. D. C. (1982). Epidemiologic Notes and Reports Persistent, Generalized Lymphadenopathy among Homosexual Males.
- CDC, C. f. D. C. (1982). Update on acquired immune deficiency syndrome (AIDS)--United States. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, 31(37), 507-508, 513-504.
- CDC, C. f. D. C. (1983). Epidemiologic Notes and Reports Persistent, Generalized Lymphadenopathy among Homosexual Males.
- CDC, C. f. D. C. (2018). HIV Transmission. Retrieved from <https://www.cdc.gov/hiv/basics/transmission.html>
- Chalermchai, T., Valcour, V., Sithinamsuwan, P., Pinyakorn, S., Clifford, D., Paul, R. H., . . . Ananworanich, J. (2013). Trail Making Test A improves performance characteristics of the International HIV Dementia Scale to identify symptomatic HAND. *J Neurovirol*, 19(2), 137-143. doi:10.1007/s13365-013-0151-4
- Chavez, L., Calvanese, V., & Verdin, E. (2015). HIV Latency Is Established Directly and Early in Both Resting and Activated Primary CD4 T Cells. *PLoS Pathog*, 11(6), e1004955. doi:10.1371/journal.ppat.1004955
- Cheret, A., Bacchus-Souffan, C., Avettand-Fenoel, V., Melard, A., Nembot, G., Blanc, C., . . . Autran, B. (2015). Combined ART started during acute HIV infection protects central memory CD4+ T cells and can induce remission. *J Antimicrob Chemother*, 70(7), 2108-2120. doi:10.1093/jac/dkv084
- Chomont, N., El-Far, M., Ancuta, P., Trautmann, L., Procopio, F. A., Yassine-Diab, B., . . . Sekaly, R. P. (2009). HIV reservoir size and persistence are driven by T cell survival and homeostatic proliferation. *Nat Med*, 15(8), 893-900. doi:10.1038/nm.1972
- Chun, T.-W., Davey Jr, R. T., Engel, D., Lane, H. C., & Fauci, A. S. (1999). Re-emergence of HIV after stopping therapy. *Nature*, 401, 874. doi:10.1038/44755

- Chun, T. W., Engel, D., Berrey, M. M., Shea, T., Corey, L., & Fauci, A. S. (1998). Early establishment of a pool of latently infected, resting CD4(+) T cells during primary HIV-1 infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *95*(15), 8869-8873.
- Chun, T. W., Nickle, D. C., Justement, J. S., Meyers, J. H., Roby, G., Hallahan, C. W., . . . Fauci, A. S. (2008). Persistence of HIV in gut-associated lymphoid tissue despite long-term antiretroviral therapy. *J Infect Dis*, *197*(5), 714-720. doi:10.1086/527324
- Chun, T. W., Stuyver, L., Mizell, S. B., Ehler, L. A., Mican, J. A., Baseler, M., . . . Fauci, A. S. (1997). Presence of an inducible HIV-1 latent reservoir during highly active antiretroviral therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *94*(24), 13193-13197.
- Cillo, A. R., Sobolewski, M. D., Bosch, R. J., Fyne, E., Piatak, M., Coffin, J. M., & Mellors, J. W. (2014). Quantification of HIV-1 latency reversal in resting CD4⁺ T cells from patients on suppressive antiretroviral therapy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *111*(19), 7078-7083. doi:10.1073/pnas.1402873111
- Coffin, J., Haase, A., Levy, J., Montagnier, L., Oroszlan, S., Teich, N., . . . al., e. (1986). Human immunodeficiency viruses. *Science*, *232*(4751), 697-697. doi:10.1126/science.3008335
- Coiras, M., López-Huertas, M. R., Pérez-Olmeda, M., & Alcamí, J. (2009). Understanding HIV-1 latency provides clues for the eradication of long-term reservoirs. *Nature Reviews Microbiology*, *7*, 798. doi:10.1038/nrmicro2223
- Colby, D. J., Trautmann, L., Pinyakorn, S., Leyre, L., Pagliuzza, A., Kroon, E., . . . Ananworanich, J. (2018). Rapid HIV RNA rebound after antiretroviral treatment interruption in persons durably suppressed in Fiebig I acute HIV infection. *Nat Med*, *24*(7), 923-926. doi:10.1038/s41591-018-0026-6
- Crooks, A. M., Bateson, R., Cope, A. B., Dahl, N. P., Griggs, M. K., Kuruc, J. D., . . . Archin, N. M. (2015). Precise Quantitation of the Latent HIV-1 Reservoir: Implications for Eradication Strategies. *J Infect Dis*, *212*(9), 1361-1365. doi:10.1093/infdis/jiv218
- de Bethune, M. P. (2010). 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*, *85*(1), 75-90. doi:10.1016/j.antiviral.2009.09.008
- De Boer, R. J. (2007). Time scales of CD4+ T cell depletion in HIV infection. *PLoS Med*, *4*(5), e193. doi:10.1371/journal.pmed.0040193
- De Cock, K. M., Fowler, M. G., Mercier, E., de Vincenzi, I., Saba, J., Hoff, E., . . . Shaffer, N. (2000). Prevention of mother-to-child HIV transmission in resource-poor countries: translating research into policy and practice. *Jama*, *283*(9), 1175-1182.
- Deeks, S. G., Kitchen, C. M., Liu, L., Guo, H., Gascon, R., Narvaez, A. B., . . . Hecht, F. M. (2004). Immune activation set point during early HIV infection predicts subsequent CD4+ T-cell changes independent of viral load. *Blood*, *104*(4), 942-947. doi:10.1182/blood-2003-09-3333
- Deeks, S. G., Lewin, S. R., Ross, A. L., Ananworanich, J., Benkirane, M., Cannon, P., . . . Zack, J. (2016). International AIDS Society global scientific strategy: towards an HIV cure 2016. *Nat Med*, *22*(8), 839-850. doi:10.1038/nm.4108
- Douek, D. C., Brenchley, J. M., Betts, M. R., Ambrozak, D. R., Hill, B. J., Okamoto, Y., . . . Koup, R. A. (2002). HIV preferentially infects HIV-specific CD4+ T cells. *Nature*, *417*(6884), 95-98. doi:10.1038/417095a

- Engelman, A., & Cherepanov, P. (2012). The structural biology of HIV-1: mechanistic and therapeutic insights. *Nat Rev Microbiol*, *10*(4), 279-290. doi:10.1038/nrmicro2747
- Englund, G., Theodore, T. S., Freed, E. O., Engelman, A., & Martin, M. A. (1995). Integration is required for productive infection of monocyte-derived macrophages by human immunodeficiency virus type 1. *J Virol*, *69*(5), 3216-3219.
- Eriksson, S., Graf, E. H., Dahl, V., Strain, M. C., Yukl, S. A., Lysenko, E. S., . . . Siliciano, J. D. (2013). Comparative analysis of measures of viral reservoirs in HIV-1 eradication studies. *PLoS Pathog*, *9*(2), e1003174. doi:10.1371/journal.ppat.1003174
- Fabre-Mersseman, V., Dutrieux, J., Louise, A., Rozlan, S., Lamine, A., Parker, R., . . . Cheynier, R. (2011). CD4(+) recent thymic emigrants are infected by HIV in vivo, implication for pathogenesis. *Aids*, *25*(9), 1153-1162. doi:10.1097/QAD.0b013e3283471e89
- Fanale-Belasio, E., Raimondo, M., Suligoi, B., & Butto, S. (2010). HIV virology and pathogenetic mechanisms of infection: a brief overview. *Ann Ist Super Sanita*, *46*(1), 5-14. doi:10.4415/ann_10_01_02
- Faria, N. R., Rambaut, A., Suchard, M. A., Baele, G., Bedford, T., Ward, M. J., . . . Lemey, P. (2014). The early spread and epidemic ignition of HIV-1 in human populations. *Science*, *346*(6205), 56-61. doi:10.1126/science.1256739
- Fauci, A. S., Pantaleo, G., Stanley, S., & Weissman, D. (1996). Immunopathogenic mechanisms of HIV infection. *Ann Intern Med*, *124*(7), 654-663.
- Fidler, S., Porter, K., Ewings, F., Frater, J., Ramjee, G., Cooper, D., . . . Babiker, A. (2013). Short-course antiretroviral therapy in primary HIV infection. *N Engl J Med*, *368*(3), 207-217. doi:10.1056/NEJMoa1110039
- Fiebig, E. W., Wright, D. J., Rawal, B. D., Garrett, P. E., Schumacher, R. T., Peddada, L., . . . Busch, M. P. (2003). Dynamics of HIV viremia and antibody seroconversion in plasma donors: implications for diagnosis and staging of primary HIV infection. *Aids*, *17*(13), 1871-1879. doi:10.1097/01.aids.0000076308.76477.b8
- Finzi, D., Blankson, J., Siliciano, J. D., Margolick, J. B., Chadwick, K., Pierson, T., . . . Siliciano, R. F. (1999). Latent infection of CD4+ T cells provides a mechanism for lifelong persistence of HIV-1, even in patients on effective combination therapy. *Nat Med*, *5*(5), 512-517. doi:10.1038/8394
- Finzi, D., Hermankova, M., Pierson, T., Carruth, L. M., Buck, C., Chaisson, R. E., . . . Siliciano, R. F. (1997). Identification of a reservoir for HIV-1 in patients on highly active antiretroviral therapy. *Science*, *278*(5341), 1295-1300.
- Fletcher, C. V., Staskus, K., Wietgreffe, S. W., Rothenberger, M., Reilly, C., Chipman, J. G., . . . Schacker, T. W. (2014). Persistent HIV-1 replication is associated with lower antiretroviral drug concentrations in lymphatic tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *111*(6), 2307-2312. doi:10.1073/pnas.1318249111
- Frange, P., Faye, A., Avettand-Fenoel, V., Bellaton, E., Descamps, D., Angin, M., . . . Saez-Cirion, A. (2016). HIV-1 virological remission lasting more than 12 years after interruption of early antiretroviral therapy in a perinatally infected teenager enrolled in the French ANRS EPF-CO10 paediatric cohort: a case report. *Lancet HIV*, *3*(1), e49-54. doi:10.1016/s2352-3018(15)00232-5
- Freed, E. O. (2015). HIV-1 assembly, release and maturation. *Nat Rev Microbiol*, *13*(8), 484-496. doi:10.1038/nrmicro3490

- Fukazawa, Y., Lum, R., Okoye, A. A., Park, H., Matsuda, K., Bae, J. Y., . . . Picker, L. J. (2015). B cell follicle sanctuary permits persistent productive simian immunodeficiency virus infection in elite controllers. *Nat Med*, *21*(2), 132-139. doi:10.1038/nm.3781
- Galvani, A. P., & Novembre, J. (2005). The evolutionary history of the CCR5-Delta32 HIV-resistance mutation. *Microbes Infect*, *7*(2), 302-309. doi:10.1016/j.micinf.2004.12.006
- Ganusov, V. V., & De Boer, R. J. (2007). Do most lymphocytes in humans really reside in the gut? *Trends Immunol*, *28*(12), 514-518. doi:10.1016/j.it.2007.08.009
- Garcia, M., Buzon, M. J., Benito, J. M., & Rallon, N. (2018). Peering into the HIV reservoir. *Rev Med Virol*, e1981. doi:10.1002/rmv.1981
- Giacomet, V., Trabattoni, D., Zanchetta, N., Biasin, M., Gismondo, M., Clerici, M., & Zuccotti, G. (2014). No cure of HIV infection in a child despite early treatment and apparent viral clearance. *Lancet*, *384*(9950), 1320. doi:10.1016/s0140-6736(14)61405-7
- Gianella, S., Smith, D. M., Vargas, M. V., Little, S. J., Richman, D. D., Daar, E. S., . . . Morris, S. R. (2013). Shedding of HIV and human herpesviruses in the semen of effectively treated HIV-1-infected men who have sex with men. *Clin Infect Dis*, *57*(3), 441-447. doi:10.1093/cid/cit252
- Gray, L. R., Roche, M., Flynn, J. K., Wesselingh, S. L., Gorry, P. R., & Churchill, M. J. (2014). Is the central nervous system a reservoir of HIV-1? *Curr Opin HIV AIDS*, *9*(6), 552-558. doi:10.1097/coh.000000000000108
- Guadalupe, M., Reay, E., Sankaran, S., Prindiville, T., Flamm, J., McNeil, A., & Dandekar, S. (2003). Severe CD4+ T-cell depletion in gut lymphoid tissue during primary human immunodeficiency virus type 1 infection and substantial delay in restoration following highly active antiretroviral therapy. *J Virol*, *77*(21), 11708-11717.
- Halfon, P., Giorgetti, C., Khiri, H., Penaranda, G., Terriou, P., Porcu-Buisson, G., & Chabert-Orsini, V. (2010). Semen may harbor HIV despite effective HAART: another piece in the puzzle. *PLoS One*, *5*(5), e10569. doi:10.1371/journal.pone.0010569
- Harrington, P. R., Schnell, G., Letendre, S. L., Ritola, K., Robertson, K., Hall, C., . . . Swanstrom, R. (2009). Cross-sectional characterization of HIV-1 env compartmentalization in cerebrospinal fluid over the full disease course. *Aids*, *23*(8), 907-915. doi:10.1097/QAD.0b013e3283299129
- Havlir, D. V., Bassett, R., Levitan, D., Gilbert, P., Tebas, P., Collier, A. C., . . . Wong, J. K. (2001). Prevalence and predictive value of intermittent viremia with combination hiv therapy. *Jama*, *286*(2), 171-179.
- Hemelaar, J. (2011). The origin and diversity of the HIV-1 pandemic. *Trends in Molecular Medicine*, *18*(3), 182-192. doi:10.1016/j.molmed.2011.12.001
- Hemelaar, J. (2012). The origin and diversity of the HIV-1 pandemic. *Trends Mol Med*, *18*(3), 182-192. doi:10.1016/j.molmed.2011.12.001
- Henrich, T. J., Hatano, H., Bacon, O., Hogan, L. E., Rutishauser, R., Hill, A., . . . Deeks, S. G. (2017). HIV-1 persistence following extremely early initiation of antiretroviral therapy (ART) during acute HIV-1 infection: An observational study. *PLoS Med*, *14*(11), e1002417. doi:10.1371/journal.pmed.1002417
- Hiener, B., Horsburgh, B. A., Eden, J. S., Barton, K., Schlub, T. E., Lee, E., . . . Palmer, S. (2017). Identification of Genetically Intact HIV-1 Proviruses in Specific CD4(+) T

- Cells from Effectively Treated Participants. *Cell Rep*, 21(3), 813-822.
doi:10.1016/j.celrep.2017.09.081
- Hill, A. L., Rosenbloom, D. I. S., Fu, F., Nowak, M. A., & Siliciano, R. F. (2014). Predicting the outcomes of treatment to eradicate the latent reservoir for HIV-1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 111(37), 13475-13480. doi:10.1073/pnas.1406663111
- Ho, D. D., Neumann, A. U., Perelson, A. S., Chen, W., Leonard, J. M., & Markowitz, M. (1995). Rapid turnover of plasma virions and CD4 lymphocytes in HIV-1 infection. *Nature*, 373(6510), 123-126. doi:10.1038/373123a0
- Ho, Y.-C., Shan, L., Hosmane, Nina N., Wang, J., Laskey, Sarah B., Rosenbloom, Daniel I. S., . . . Siliciano, Robert F. (2013). Replication-Competent Noninduced Proviruses in the Latent Reservoir Increase Barrier to HIV-1 Cure. *Cell*, 155(3), 540-551.
doi:<https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.09.020>
- Hocqueloux, L., Avettand-Fenoel, V., Jacquot, S., Prazuck, T., Legac, E., Melard, A., . . . Rouzioux, C. (2013). Long-term antiretroviral therapy initiated during primary HIV-1 infection is key to achieving both low HIV reservoirs and normal T cell counts. *J Antimicrob Chemother*, 68(5), 1169-1178. doi:10.1093/jac/dks533
- Hocqueloux, L., Prazuck, T., Avettand-Fenoel, V., Lafeuillade, A., Cardon, B., Viard, J. P., & Rouzioux, C. (2010). Long-term immunovirologic control following antiretroviral therapy interruption in patients treated at the time of primary HIV-1 infection. *Aids*, 24(10), 1598-1601.
- Hughes, A., Barber, T., & Nelson, M. (2008). New treatment options for HIV salvage patients: An overview of second generation PIs, NNRTIs, integrase inhibitors and CCR5 antagonists. *Journal of Infection*, 57(1), 1-10.
doi:<https://doi.org/10.1016/j.jinf.2008.05.006>
- Hutter, G., Nowak, D., Mossner, M., Ganepola, S., Mussig, A., Allers, K., . . . Thiel, E. (2009). Long-term control of HIV by CCR5 Delta32/Delta32 stem-cell transplantation. *N Engl J Med*, 360(7), 692-698. doi:10.1056/NEJMoa0802905
- Hymes, K. B., Cheung, T., Greene, J. B., Prose, N. S., Marcus, A., Ballard, H., . . . Laubenstein, L. J. (1981). Kaposi's sarcoma in homosexual men-a report of eight cases. *Lancet*, 2(8247), 598-600.
- Jaafoura, S., de Goer de Herve, M. G., Hernandez-Vargas, E. A., Hendel-Chavez, H., Abdoh, M., Mateo, M. C., . . . Taoufik, Y. (2014). Progressive contraction of the latent HIV reservoir around a core of less-differentiated CD4(+) memory T Cells. *Nat Commun*, 5, 5407. doi:10.1038/ncomms6407
- Jenabian, M. A., Costiniuk, C. T., Mehraj, V., Ghazawi, F. M., Fromentin, R., Brousseau, J., . . . Routy, J. P. (2016). Immune tolerance properties of the testicular tissue as a viral sanctuary site in ART-treated HIV-infected adults. *Aids*, 30(18), 2777-2786.
doi:10.1097/qad.0000000000001282
- Josefsson, L., von Stockenström, S., Faria, N. R., Sinclair, E., Bacchetti, P., Killian, M., . . . Palmer, S. (2013). The HIV-1 reservoir in eight patients on long-term suppressive antiretroviral therapy is stable with few genetic changes over time. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110(51), E4987-4996. doi:10.1073/pnas.1308313110
- Kim, Y., Anderson, J. L., & Lewin, S. R. (2018). Getting the “Kill” into “Shock and Kill”: Strategies to Eliminate Latent HIV. *Cell Host Microbe*, 23(1), 14-26.
doi:<https://doi.org/10.1016/j.chom.2017.12.004>

- Kirschner, D. E., & Webb, G. F. (1997). Understanding drug resistance for monotherapy treatment of HIV infection. *Bull Math Biol*, 59(4), 763-785.
- Kulpa, D. A., & Chomont, N. (2015). HIV persistence in the setting of antiretroviral therapy: when, where and how does HIV hide? *J Virus Erad*, 1(2), 59-66.
- Kumar, N., Chahroudi, A., & Silvestri, G. (2016). Animal models to achieve an HIV cure. *Curr Opin HIV AIDS*, 11(4), 432-441. doi:10.1097/COH.0000000000000290
- Kuritzkes, D. R. (2009). HIV-1 Entry Inhibitors: An Overview. *Curr Opin HIV AIDS*, 4(2), 82-87. doi:10.1097/COH.0b013e328322402e
- Lam, P. Y., Jadhav, P. K., Eyermann, C. J., Hodge, C. N., Ru, Y., Bacheler, L. T., . . . et al. (1994). Rational design of potent, bioavailable, nonpeptide cyclic ureas as HIV protease inhibitors. *Science*, 263(5145), 380-384.
- Larder, B. A., Darby, G., & Richman, D. D. (1989). HIV with reduced sensitivity to zidovudine (AZT) isolated during prolonged therapy. *Science*, 243(4899), 1731-1734.
- Lataillade, M., & Kozal, M. J. (2006). The hunt for HIV-1 integrase inhibitors. *AIDS Patient Care STDS*, 20(7), 489-501. doi:10.1089/apc.2006.20.489
- Launay, O., Tod, M., Tschope, I., Si-Mohamed, A., Belarbi, L., Charpentier, C., . . . Belec, L. (2011). Residual HIV-1 RNA and HIV-1 DNA production in the genital tract reservoir of women treated with HAART: the prospective ANRS EP24 GYNODYN study. *Antivir Ther*, 16(6), 843-852. doi:10.3851/imp1856
- Lee, B., Sharron, M., Montaner, L. J., Weissman, D., & Doms, R. W. (1999). Quantification of CD4, CCR5, and CXCR4 levels on lymphocyte subsets, dendritic cells, and differentially conditioned monocyte-derived macrophages. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(9), 5215-5220. doi:10.1073/pnas.96.9.5215
- Lee, G. Q., & Lichterfeld, M. (2016). Diversity of HIV-1 reservoirs in CD4 T cell subsets. *Curr Opin HIV AIDS*, 11(4), 383-387. doi:10.1097/COH.0000000000000281
- Lees, J. R., & Farber, D. L. (2010). Generation, persistence and plasticity of CD4 T-cell memories. *Immunology*, 130(4), 463-470. doi:10.1111/j.1365-2567.2010.03288.x
- Lehmann, C., Wyen, C., & Fatkenheuer, G. (2013). Short-course antiretroviral therapy in primary HIV infection. *N Engl J Med*, 368(21), 2036. doi:10.1056/NEJMc1303486
- Letvin, N. L., & Walker, B. D. (2003). Immunopathogenesis and immunotherapy in AIDS virus infections. *Nat Med*, 9(7), 861-866. doi:10.1038/nm0703-861
- Li, G., & De Clercq, E. (2016). HIV Genome-Wide Protein Associations: a Review of 30 Years of Research. *Microbiol Mol Biol Rev*, 80(3), 679-731. doi:10.1128/mmbr.00065-15
- Lodi, S., Meyer, L., Kelleher, A. D., Rosinska, M., Ghosn, J., Sannes, M., & Porter, K. (2012). Immunovirologic control 24 months after interruption of antiretroviral therapy initiated close to HIV seroconversion. *Arch Intern Med*, 172(16), 1252-1255. doi:10.1001/archinternmed.2012.2719
- Lorenzo-Redondo, R., Fryer, H. R., Bedford, T., Kim, E. Y., Archer, J., Pond, S. L. K., . . . Wolinsky, S. M. (2016). Persistent HIV-1 replication maintains the tissue reservoir during therapy. *Nature*, 530(7588), 51-56. doi:10.1038/nature16933
- Luzuriaga, K., Gay, H., Ziemniak, C., Sanborn, K. B., Somasundaran, M., Rainwater-Lovett, K., . . . Persaud, D. (2015). Viremic relapse after HIV-1 remission in a perinatally infected child. *N Engl J Med*, 372(8), 786-788. doi:10.1056/NEJMc1413931
- Lv, Z., Chu, Y., & Wang, Y. (2015). HIV protease inhibitors: a review of molecular selectivity and toxicity. *HIV/AIDS (Auckland, N.Z.)*, 7, 95-104. doi:10.2147/HIV.S79956

- Maartens, G., Celum, C., & Lewin, S. R. (2014). HIV infection: epidemiology, pathogenesis, treatment, and prevention. *The Lancet*, *384*(9939), 258-271. doi:[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)60164-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(14)60164-1)
- Maldarelli, F., Wu, X., Su, L., Simonetti, F. R., Shao, W., Hill, S., . . . Hughes, S. H. (2014). HIV latency. Specific HIV integration sites are linked to clonal expansion and persistence of infected cells. *Science*, *345*(6193), 179-183. doi:10.1126/science.1254194
- Marcus Altfeld, A. B., Dirk Berzow, Christoph Boesecke, Patrick Braun, Thomas Buhk, Rob Camp, rika Draenert, Christian Eggers, Stefan Esser, Gerd Fätkenheuer, Gunar Günther, Thomas Harrer, Christian Herzmann, Christian Hoffmann, Heinz-August Horst, Martin Hower, Christoph Lange, Thore Lorenzen, Tim Niehues, Christian Noah, Ramona Pauli, Ansgar Rieke, Jürgen kurt Rockstroh, Thorsten Rosenkranz, Bernhard Schaaf, Ulrike Sonnenberg-schwan, Christoph D. Spinner, Thomas Splettstoesser, Matthias Stoll, Hendrik Streeck, Jan Thoden, Markus Unnewehr, Mechthild Vocks-Hauck, Jan-Christian Wasmuth, Michael Weigel, Tomas Weitzel, Eva Wolf. (2015). *HIV 2015/16: Medizin Fokus Verlag*.
- Marsden, M. D., & Zack, J. A. (2015). Double trouble: HIV latency and CTL escape. *Cell Host Microbe*, *17*(2), 141-142. doi:10.1016/j.chom.2015.01.008
- Massanella, M., Fromentin, R., & Chomont, N. (2016). Residual inflammation and viral reservoirs: alliance against an HIV cure. *Curr Opin HIV AIDS*, *11*(2), 234-241. doi:10.1097/coh.0000000000000230
- Masur, H., Michelis, M. A., Greene, J. B., Onorato, I., Stouwe, R. A., Holzman, R. S., . . . Cunningham-Rundles, S. (1981). An outbreak of community-acquired *Pneumocystis carinii* pneumonia: initial manifestation of cellular immune dysfunction. *N Engl J Med*, *305*(24), 1431-1438. doi:10.1056/nejm198112103052402
- McMichael, A. J., Borrow, P., Tomaras, G. D., Goonetilleke, N., & Haynes, B. F. (2010). The immune response during acute HIV-1 infection: clues for vaccine development. *Nat Rev Immunol*, *10*(1), 11-23. doi:10.1038/nri2674
- Mehandru, S., Poles, M. A., Tenner-Racz, K., Horowitz, A., Hurley, A., Hogan, C., . . . Markowitz, M. (2004). Primary HIV-1 infection is associated with preferential depletion of CD4+ T lymphocytes from effector sites in the gastrointestinal tract. *J Exp Med*, *200*(6), 761-770. doi:10.1084/jem.20041196
- Mehandru, S., Poles, M. A., Tenner-Racz, K., Jean-Pierre, P., Manuelli, V., Lopez, P., . . . Markowitz, M. (2006). Lack of mucosal immune reconstitution during prolonged treatment of acute and early HIV-1 infection. *PLoS Med*, *3*(12), e484. doi:10.1371/journal.pmed.0030484
- Mexas, A. M., Graf, E. H., Pace, M. J., Yu, J. J., Papasavvas, E., Azzoni, L., . . . O'Doherty, U. (2012). Concurrent measures of total and integrated HIV DNA monitor reservoirs and ongoing replication in eradication trials. *Aids*, *26*(18), 2295-2306. doi:10.1097/QAD.0b013e32835a5c2f
- Moir, S., Chun, T. W., & Fauci, A. S. (2011). Pathogenic mechanisms of HIV disease. *Annu Rev Pathol*, *6*, 223-248. doi:10.1146/annurev-pathol-011110-130254
- Nachega, J. B., Parienti, J. J., Uthman, O. A., Gross, R., Dowdy, D. W., Sax, P. E., . . . Giordano, T. P. (2014). Lower pill burden and once-daily antiretroviral treatment regimens for HIV infection: A meta-analysis of randomized controlled trials. *Clin Infect Dis*, *58*(9), 1297-1307. doi:10.1093/cid/ciu046

- Nishimura, Y., Gautam, R., Chun, T. W., Sadjadpour, R., Foulds, K. E., Shingai, M., . . . Martin, M. A. (2017). Early antibody therapy can induce long-lasting immunity to SHIV. *Nature*, *543*(7646), 559-563. doi:10.1038/nature21435
- Novembre, J., Galvani, A. P., & Slatkin, M. (2005). The geographic spread of the CCR5 Delta32 HIV-resistance allele. *PLoS Biol*, *3*(11), e339. doi:10.1371/journal.pbio.0030339
- O'Doherty, U., Swiggard, W. J., Jeyakumar, D., McGain, D., & Malim, M. H. (2002). A sensitive, quantitative assay for human immunodeficiency virus type 1 integration. *J Virol*, *76*(21), 10942-10950.
- Okoye, A. A., Hansen, S. G., Vaidya, M., Fukazawa, Y., Park, H., Duell, D. M., . . . Lifson, J. D. (2018). Early antiretroviral therapy limits SIV reservoir establishment to delay or prevent post-treatment viral rebound. *Nat Med*, *24*(9), 1430-1440. doi:10.1038/s41591-018-0130-7
- Palmer, S., Maldarelli, F., Wiegand, A., Bernstein, B., Hanna, G. J., Brun, S. C., . . . King, M. S. (2008). Low-level viremia persists for at least 7 years in patients on suppressive antiretroviral therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *105*(10), 3879-3884. doi:10.1073/pnas.0800050105
- Palmer, S., Wiegand, A. P., Maldarelli, F., Bazmi, H., Mican, J. M., Polis, M., . . . Coffin, J. M. (2003). New real-time reverse transcriptase-initiated PCR assay with single-copy sensitivity for human immunodeficiency virus type 1 RNA in plasma. *J Clin Microbiol*, *41*(10), 4531-4536.
- Pancera, M., Majeed, S., Ban, Y. E., Chen, L., Huang, C. C., Kong, L., . . . Kwong, P. D. (2010). Structure of HIV-1 gp120 with gp41-interactive region reveals layered envelope architecture and basis of conformational mobility. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *107*(3), 1166-1171. doi:10.1073/pnas.0911004107
- Perreau, M., Savoye, A. L., De Crignis, E., Corpataux, J. M., Cubas, R., Haddad, E. K., . . . Pantaleo, G. (2013). Follicular helper T cells serve as the major CD4 T cell compartment for HIV-1 infection, replication, and production. *J Exp Med*, *210*(1), 143-156. doi:10.1084/jem.20121932
- Procopio, F. A., Fromentin, R., Kulpa, D. A., Brehm, J. H., Bebin, A. G., Strain, M. C., . . . Chomont, N. (2015). A Novel Assay to Measure the Magnitude of the Inducible Viral Reservoir in HIV-infected Individuals. *EBioMedicine*, *2*(8), 874-883. doi:10.1016/j.ebiom.2015.06.019
- Robinson, H. L. (2002). New hope for an AIDS vaccine. *Nat Rev Immunol*, *2*(4), 239-250. doi:10.1038/nri776
- Ryu, W.-S. (2017). *Molecular Virology of Human Pathogenic Viruses* (1st Edition ed.).
- Saez-Cirion, A., Bacchus, C., Hocqueloux, L., Avettand-Fenoel, V., Girault, I., Lecuroux, C., . . . Rouzioux, C. (2013). Post-treatment HIV-1 controllers with a long-term virological remission after the interruption of early initiated antiretroviral therapy ANRS VISCONTI Study. *PLoS Pathog*, *9*(3), e1003211. doi:10.1371/journal.ppat.1003211
- Salgado, M., Rabi, S. A., O'Connell, K. A., Buckheit, R. W., 3rd, Bailey, J. R., Chaudhry, A. A., . . . Blankson, J. N. (2011). Prolonged control of replication-competent dual-tropic human immunodeficiency virus-1 following cessation of highly active antiretroviral therapy. *Retrovirology*, *8*, 97. doi:10.1186/1742-4690-8-97

- Sallusto, F., Geginat, J., & Lanzavecchia, A. (2004). Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance. *Annu Rev Immunol*, *22*, 745-763. doi:10.1146/annurev.immunol.22.012703.104702
- Sathaliyawala, T., Kubota, M., Yudanin, N., Turner, D., Camp, P., Thome, J. J., . . . Farber, D. L. (2013). Distribution and compartmentalization of human circulating and tissue-resident memory T cell subsets. *Immunity*, *38*(1), 187-197. doi:10.1016/j.immuni.2012.09.020
- Schackman, B. R., Fleishman, J. A., Su, A. E., Berkowitz, B. K., Moore, R. D., Walensky, R. P., . . . Losina, E. (2015). The Lifetime Medical Cost Savings from Preventing HIV in the United States. *Medical care*, *53*(4), 293-301. doi:10.1097/MLR.0000000000000308
- Schnell, G., Spudich, S., Harrington, P., Price, R. W., & Swanstrom, R. (2009). Compartmentalized human immunodeficiency virus type 1 originates from long-lived cells in some subjects with HIV-1-associated dementia. *PLoS Pathog*, *5*(4), e1000395. doi:10.1371/journal.ppat.1000395
- Schuetz, A., Deleage, C., Sereti, I., Rerknimitr, R., Phanuphak, N., Phuang-Ngern, Y., . . . Ananworanich, J. (2014). Initiation of ART during early acute HIV infection preserves mucosal Th17 function and reverses HIV-related immune activation. *PLoS Pathog*, *10*(12), e1004543. doi:10.1371/journal.ppat.1004543
- Seitz, R. (2016). Human Immunodeficiency Virus (HIV). *Transfus Med Hemother*, *43*(3), 203-222. doi:10.1159/000445852
- Sharp, P. M., & Hahn, B. H. (2011). Origins of HIV and the AIDS pandemic. *Cold Spring Harb Perspect Med*, *1*(1), a006841. doi:10.1101/cshperspect.a006841
- Shaw, G. M., & Hunter, E. (2012). HIV transmission. *Cold Spring Harb Perspect Med*, *2*(11). doi:10.1101/cshperspect.a006965
- Siliciano, J. D., Kajdas, J., Finzi, D., Quinn, T. C., Chadwick, K., Margolick, J. B., . . . Siliciano, R. F. (2003). Long-term follow-up studies confirm the stability of the latent reservoir for HIV-1 in resting CD4+ T cells. *Nat Med*, *9*(6), 727-728. doi:10.1038/nm880
- Siliciano, J. D., & Siliciano, R. F. (2005). Enhanced culture assay for detection and quantitation of latently infected, resting CD4+ T-cells carrying replication-competent virus in HIV-1-infected individuals. *Methods Mol Biol*, *304*, 3-15. doi:10.1385/1-59259-907-9:003
- Simon, V., Ho, D. D., & Abdool Karim, Q. (2006). HIV/AIDS epidemiology, pathogenesis, prevention, and treatment. *The Lancet*, *368*(9534), 489-504. doi:[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(06\)69157-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(06)69157-5)
- Sloan, R. D., & Wainberg, M. A. (2011). The role of unintegrated DNA in HIV infection. *Retrovirology*, *8*, 52-52. doi:10.1186/1742-4690-8-52
- Stein, J., Storcksdieck Genannt Bonsmann, M., & Streeck, H. (2016). Barriers to HIV Cure. *Hla*, *88*(4), 155-163. doi:10.1111/tan.12867
- Strain, M. C., Little, S. J., Daar, E. S., Havlir, D. V., Gunthard, H. F., Lam, R. Y., . . . Wong, J. K. (2005). Effect of treatment, during primary infection, on establishment and clearance of cellular reservoirs of HIV-1. *J Infect Dis*, *191*(9), 1410-1418. doi:10.1086/428777
- Streeck, H., & Nixon, D. F. (2010). T cell immunity in acute HIV-1 infection. *J Infect Dis*, *202* Suppl 2, S302-308. doi:10.1086/655652

- Svicher, V., Ceccherini-Silberstein, F., Antinori, A., Aquaro, S., & Perno, C. F. (2014). Understanding HIV Compartments and Reservoirs. *Current HIV/AIDS Reports*, 11(2), 186-194. doi:10.1007/s11904-014-0207-y
- Takata, H., Buranapraditkun, S., Kessing, C., Fletcher, J. L., Muir, R., Tardif, V., . . . Trautmann, L. (2017). Delayed differentiation of potent effector CD8(+) T cells reducing viremia and reservoir seeding in acute HIV infection. *Sci Transl Med*, 9(377). doi:10.1126/scitranslmed.aag1809
- UNAIDS. (1998). A review of HIV transmission through breastfeeding. Retrieved from http://www.unaids.org/sites/default/files/media_asset/jc180-hiv-infantfeeding-3_en_0.pdf
- UNAIDS. (2014). *the Gap report*. Retrieved from http://www.unaids.org/sites/default/files/media_asset/UNAIDS_Gap_report_en.pdf
- UNAIDS. (2017). *Fact Sheet 2017*. Retrieved from <http://www.unaids.org/en/resources/fact-sheet>
- Vandergeeten, C., Fromentin, R., DaFonseca, S., Lawani, M. B., Sereti, I., Lederman, M. M., . . . Chomont, N. (2013). Interleukin-7 promotes HIV persistence during antiretroviral therapy. *Blood*, 121(21), 4321-4329. doi:10.1182/blood-2012-11-465625
- Vandergeeten, C., Fromentin, R., Merlini, E., Lawani, M. B., DaFonseca, S., Bakeman, W., . . . Chomont, N. (2014). Cross-clade ultrasensitive PCR-based assays to measure HIV persistence in large-cohort studies. *J Virol*, 88(21), 12385-12396. doi:10.1128/jvi.00609-14
- Vinikoor, M. J., Cope, A., Gay, C. L., Ferrari, G., McGee, K. S., Kuruc, J. D., . . . Eron, J. J. (2013). Antiretroviral therapy initiated during acute HIV infection fails to prevent persistent T-cell activation. *J Acquir Immune Defic Syndr*, 62(5), 505-508. doi:10.1097/QAI.0b013e318285cd33
- von Stockenstrom, S., Odevall, L., Lee, E., Sinclair, E., Bacchetti, P., Killian, M., . . . Palmer, S. (2015). Longitudinal Genetic Characterization Reveals That Cell Proliferation Maintains a Persistent HIV Type 1 DNA Pool During Effective HIV Therapy. *J Infect Dis*, 212(4), 596-607. doi:10.1093/infdis/jiv092
- Wada, N. I., Jacobson, L. P., Margolick, J. B., Breen, E. C., Macatangay, B., Penugonda, S., . . . Bream, J. H. (2015). The effect of HAART-induced HIV suppression on circulating markers of inflammation and immune activation. *Aids*, 29(4), 463-471. doi:10.1097/qad.0000000000000545
- Wagner, T. A., McLaughlin, S., Garg, K., Cheung, C. Y., Larsen, B. B., Styrchak, S., . . . Frenkel, L. M. (2014). HIV latency. Proliferation of cells with HIV integrated into cancer genes contributes to persistent infection. *Science*, 345(6196), 570-573. doi:10.1126/science.1256304
- Wei, X., Decker, J. M., Wang, S., Hui, H., Kappes, J. C., Wu, X., . . . Shaw, G. M. (2003). Antibody neutralization and escape by HIV-1. *Nature*, 422(6929), 307-312. doi:10.1038/nature01470
- Wei, X., Ghosh, S. K., Taylor, M. E., Johnson, V. A., Emini, E. A., Deutsch, P., . . . et al. (1995). Viral dynamics in human immunodeficiency virus type 1 infection. *Nature*, 373(6510), 117-122. doi:10.1038/373117a0
- Whitney, J. B., Hill, A. L., Sanisetty, S., Penaloza-MacMaster, P., Liu, J., Shetty, M., . . . Barouch, D. H. (2014). Rapid seeding of the viral reservoir prior to SIV viraemia in rhesus monkeys. *Nature*, 512(7512), 74-77. doi:10.1038/nature13594

- WHO, W. H. O. (2017). HIV/AIDS. Retrieved from <http://www.who.int/features/qa/71/en/>
- Wightman, F., Solomon, A., Khoury, G., Green, J. A., Gray, L., Gorry, P. R., . . . Lewin, S. R. (2010). Both CD31(+) and CD31(-) naive CD4(+) T cells are persistent HIV type 1-infected reservoirs in individuals receiving antiretroviral therapy. *J Infect Dis*, *202*(11), 1738-1748. doi:10.1086/656721
- Wiskerchen, M., & Muesing, M. A. (1995). Human immunodeficiency virus type 1 integrase: effects of mutations on viral ability to integrate, direct viral gene expression from unintegrated viral DNA templates, and sustain viral propagation in primary cells. *J Virol*, *69*(1), 376-386.
- Wong, J. K., Hezareh, M., Gunthard, H. F., Havlir, D. V., Ignacio, C. C., Spina, C. A., & Richman, D. D. (1997). Recovery of replication-competent HIV despite prolonged suppression of plasma viremia. *Science*, *278*(5341), 1291-1295.
- Wu, L., & KewalRamani, V. N. (2006). Dendritic-cell interactions with HIV: infection and viral dissemination. *Nat Rev Immunol*, *6*(11), 859-868. doi:10.1038/nri1960
- Wu, Y. (2004). HIV-1 gene expression: lessons from provirus and non-integrated DNA. *Retrovirology*, *1*(1), 13. doi:10.1186/1742-4690-1-13
- Youle, M. (2007). Overview of boosted protease inhibitors in treatment-experienced HIV-infected patients. *J Antimicrob Chemother*, *60*(6), 1195-1205. doi:10.1093/jac/dkm364
- Yukl, S. A., Gianella, S., Sinclair, E., Epling, L., Li, Q., Duan, L., . . . Wong, J. K. (2010). Differences in HIV burden and immune activation within the gut of HIV-positive patients receiving suppressive antiretroviral therapy. *J Infect Dis*, *202*(10), 1553-1561. doi:10.1086/656722

Affiche CROI 2017

#0948
 Louise Leyre
Louise.Leyre@umontreal.ca
 Nicolas Chomont
Nicolas.chomont@umontreal.ca

CRCHUM
 Université de Montréal

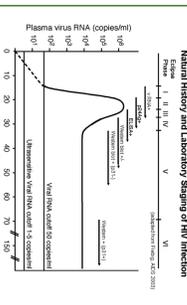
Background

- HIV persists in long-lived CD4⁺ T cells in individuals treated with antiretroviral therapy (ART)
- Initiation of ART during primary HIV infection restricts the size of the HIV reservoir

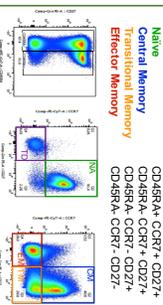
Objective: To characterize the CD4⁺ T cell subsets in phase of HIV infection

Methodology

Acutely infected participants were recruited from the National Institutes of Health (NIH) and categorized according to Fielding stages



Memory CD4⁺ T cell subsets from blood were sorted by FACS (BDAll):

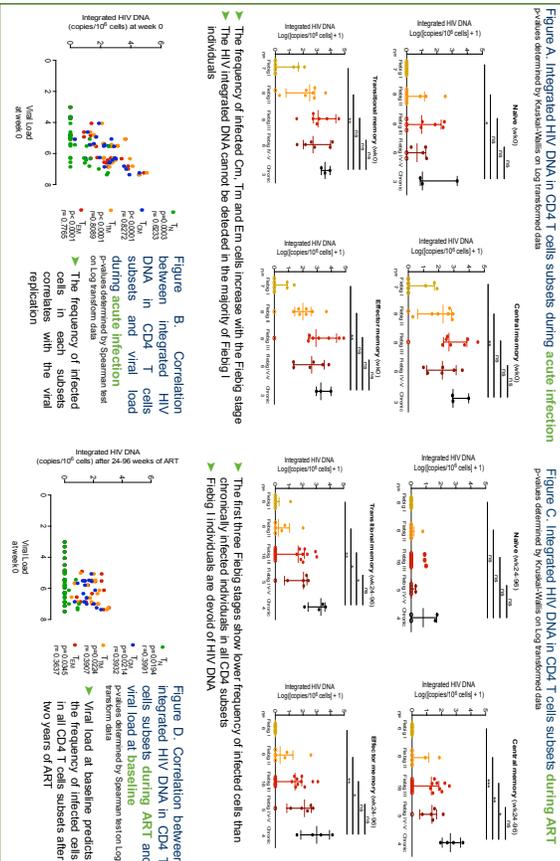


The frequency of HIV-infected cells was measured by integrated HIV DNA-PCR for (N=69):
 Untreated individuals (wk 0) (N=32) (Fielding I, N=7, Fielding II=5, Fielding III, N=8, Fielding IV, V, N=6, Chronic N=3)
 Treated individuals (ART) (N=37) (Fielding I, N=6, Fielding II, N=5, Fielding III, N=16, Fielding IV, V, N=5, Chronic N=4)

Altered stability of HIV-infected memory cells following very early ART

Centre de Recherche du CHUM, Montréal, Canada; Department of microbiology, Infectology and Immunology, Université de Montréal, Canada; MHRP, WRAR, Silver Spring, MD, USA; Vaccine and Gene Therapy Institute, Florida, FL, USA; SEARHC - Thai Red Cross AIDS Research Centre, Bangkok, Thailand; Department of Retrovirology, Armed Forces Research Institute of Medical Sciences, Bangkok, Thailand

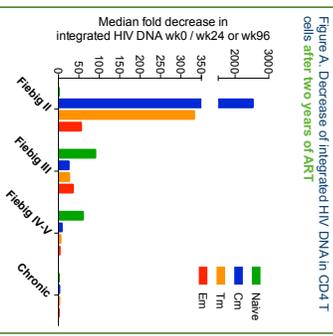
Frequency of infected cells in CD4 subsets in acute infection and during ART



Conclusions

- Memory cells harbouring integrated HIV DNA rapidly accumulate as plasma viral load increases
- Fielding I participants display lower frequencies of infected cells in all CD4 subsets than any other HIV-infected individuals and are mostly undetectable
- ART initiated during chronic infection or at Fielding stage IV-V has low (if any) impact on the amount of integrated HIV DNA in memory subsets.
- Initiation of ART in early infection (Fielding I-III) decreases drastically the frequency of infected CD4⁺ Tcm and Tm cells
- The HIV integrated DNA cannot be detected in the majority of Fielding I individuals
- These results suggest that the majority of memory cells infected during acute infection are short-lived

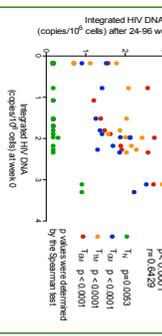
Effect of ART



Drastic decrease in Memory subsets in Fielding I and II
 The reservoir in Fielding IV-V and chronically infected individuals remains relatively stable
 Fielding I individuals have already very low frequency of infected cells before ART

Figure A. Decrease of integrated HIV DNA in CD4⁺ T cells after two years of ART

Figure B. Correlation of integrated HIV DNA in CD4⁺ T cells subsets before and after two years of ART



The frequency of infected cells at baseline predicts the frequency of infected cells after two years of ART

amfar
 AMFAR AIDS FOUNDATION
 AMFAR
 AMFAR AIDS FOUNDATION
 AMFAR AIDS FOUNDATION
 AMFAR AIDS FOUNDATION

Amfar Development: The authors thank Dominique Guadalupe and Marie-Odette Fleury-Owen for their contribution to the development of the Amfar logo. The authors acknowledge HIV-1 integrase specific antibody (Amfar) for its contribution to the development of Amfar.

Affiche IAS 2017

MOPEA0081

CRCHUM

Louise Leyre
Lnl.leyre@umontreal.ca

Université
de Montréal

Nicolas Chomont
Nicolas.chomont@umontreal.ca

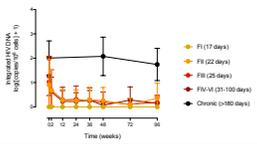
Low frequencies of HIV-infected cells in blood, colon, and lymph node at the earliest stage of acute infection (Fiebig I)

Louise Leyre^{1,2}, Jintanat Ananworanich^{3,4}, Claire Vandergaeten⁵, Eugène Kroon⁶, Nitiya Chomchey⁶, Carlo Sacdalan⁶, Supanee Buranapraditkun^{3,4}, Siriwat Akapirat⁷, Nittaya Phanuphak⁸, Merlin Robb^{3,4}, Nelson Michael^{1,4}, Lydie Trautmann^{3,4} and Nicolas Chomont^{1,2} on behalf of the RV254/SEARCH 010 and RV304 Study groups⁹

¹Centre de Recherche du CHUM, Montréal, Canada; ²Department of microbiology, infectious and immunology, Université de Montréal, Canada; ³Henry M. Jackson Foundation Advancement of Military Medicine, Bethesda, MD, USA; ⁴U.S. Military HIV Research Program, Walter Reed Army Institute of Research, Silver Spring, MD, USA; ⁵Vaccine and Gene therapy Institute-Florida, FL, USA; ⁶SEARCH, Thai Red Cross AIDS Research Centre, Bangkok, Thailand; ⁷Department of Retrovirology, Armed Forces Research Institute of Medical Sciences, Bangkok, Thailand

Background

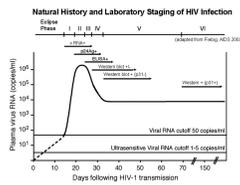
- The HIV reservoir is established very early in a small pool of cells
- Initiation of ART during primary HIV infection restricts the size of the HIV reservoir in the blood



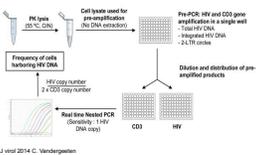
Objective: To characterize the establishment and persistence of HIV reservoirs in lymph node, colon and blood during acute infection and early ART initiation

Methodology

- Acutely infected participants were recruited from the Thai Red Cross Anonymous Clinic in Bangkok, Thailand into RV254 / SEARCH10 protocol and categorized according to Fiebig stages



- Integrated HIV DNA was measured in PBMCs, lymph node mononuclear cells (LNMCs) and gut biopsies from acutely HIV-infected individuals



- The frequency of HIV infected cells was measured by PCR for integrated HIV DNA in N=570 samples.

Untreated individuals (wk 0) N=235

- Lymph node N=31 (Fiebig I N=6, Fiebig II N=6, Fiebig III N=9, Fiebig IV-V N=6, Chronic N=4)
- Gut biopsies N=70 (Fiebig I N=6, Fiebig II N=15, Fiebig III N=29, Fiebig IV-V N=13, Chronic N=7)
- Blood N=134 (Fiebig I N=12, Fiebig II N=31, Fiebig III N=41, Fiebig IV-V N=13, Chronic N=37)

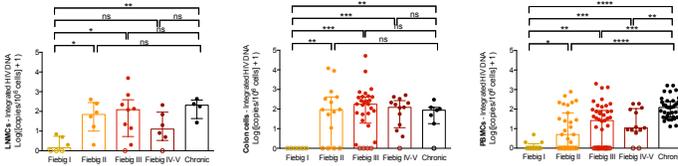
Treated individuals (ART-wk 24/48/96) N=335

- Lymph node N=30 (Fiebig I N=6, Fiebig II N=5, Fiebig III N=11, Fiebig IV-V N=7, Chronic N=1)
- Gut biopsies N=56 (Fiebig I N=8, Fiebig II N=13, Fiebig III N=24, Fiebig IV-V N=7, Chronic N=4)
- Blood N=249 (Fiebig I N=33, Fiebig II N=60, Fiebig III N=84, Fiebig IV-V N=30, Chronic N=42)

Frequency of infected cells in blood and tissues during acute infection and during ART

Integrated HIV DNA during acute infection in lymph node, colon and blood

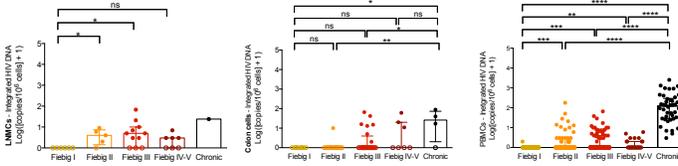
p-values determined by Mann-Whitney on Log transformed data



- During acute HIV infection, Fiebig I individuals display lower frequencies of infected cells in blood, colon and lymph node than any other HIV-infected individual
- Fiebig II to V individuals show similar frequencies of infected cells than chronic individuals in lymph node and colon
- However Fiebig II to V individuals display lower frequencies of infected cells in the blood than chronically infected individuals

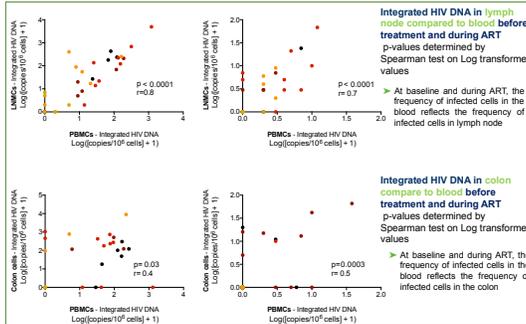
Integrated HIV DNA during ART in lymph node, colon and blood

p-values determined by Mann-Whitney on Log transformed data



- After six months to two years of ART, most Fiebig I individuals display undetectable levels of integrated HIV DNA in blood and tissues
- In blood and colon, Fiebig II to V individuals harbor lower frequencies of infected cells than participants who started ART in chronic infection (same trend in lymph node)

Correlation of integrated HIV DNA in blood and tissues



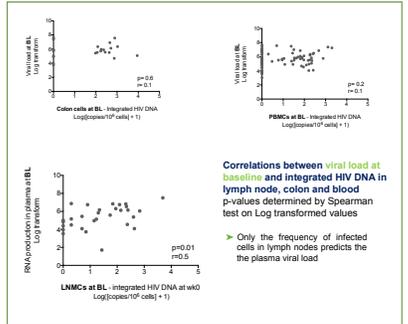
Integrated HIV DNA in lymph node compared to blood before treatment and during ART
p-values determined by Spearman test on Log transformed values

- At baseline and during ART, the frequency of infected cells in the blood reflects the frequency of infected cells in lymph node

Integrated HIV DNA in colon compared to blood before treatment and during ART
p-values determined by Spearman test on Log transformed values

- At baseline and during ART, the frequency of infected cells in the blood reflects the frequency of infected cells in the colon

HIV DNA in different compartments compared to viral load



Correlations between viral load at baseline and integrated HIV DNA in lymph node, colon and blood
p-values determined by Spearman test on Log transformed values

- Only the frequency of infected cells in lymph nodes predicts the the plasma viral load

Conclusions

- During acute and chronic infection the frequency of infected cells is similar in the blood and tissues such as colon and lymph nodes
- In all compartments, Fiebig I individuals display lower frequencies of infected cells than any other HIV-infected individual
- Fiebig II to V individuals display similar levels of integrated HIV DNA than chronically infected individuals in blood and tissues
- Levels of integrated HIV DNA at baseline in lymph nodes correlates with plasma viral load
- After six months to two years of ART, most Fiebig I individuals display undetectable levels of integrated HIV DNA in blood and tissues

With ART, levels of integrated HIV DNA decrease in all acutely treated individuals in blood and tissues whereas chronically treated individuals maintain similar levels of infected cells before and after ART in all compartments



Acknowledgements: The authors acknowledge HIV-infected participants for their gift of leukapheresis and biopsies

The views expressed are those of the authors and should not be construed to represent the positions of the U.S. Army or the Department of Defense.

