

Université de Montréal

**Étude de l'établissement des réservoirs du VIH-1 et de
l'impact de l'initiation précoce du traitement sur ces
réservoirs chez l'enfant infecté par le VIH-1**

par

Bayader Annabi

Département de microbiologie, infectiologie et immunologie
Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté de médecine
en vue de l'obtention du grade de MSc
en microbiologie et immunologie

Novembre 2019

Résumé

L'obstacle majeur à l'éradication du VIH est l'existence de réservoirs cellulaires du VIH, qui échappent au traitement et à la réponse immunitaire de l'hôte. Ce réservoir s'établit très tôt dans l'infection, menant typiquement à la destruction d'un grand nombre de lymphocytes T CD4+. Cependant, une faible proportion de ces cellules retourne à l'état quiescent en ayant intégré le génome viral. La taille et l'évolution du réservoir chez l'adulte ont été bien élucidées. Cependant, on en sait moins sur la taille et la distribution du réservoir du VIH, et sur l'impact de l'initiation précoce de la thérapie antirétrovirale combinée (TARc) sur ces dernières dans la population infantile. Cet essai s'inscrit dans le cadre de l'étude prospective multicentrique EPIC₄ (Early Pediatric Initiation, Canada Child Cure Cohort Study), qui a recruté 221 enfants infectés par la voie verticale dans neuf centres pédiatriques canadiens. Nous soumettons l'hypothèse que l'initiation très précoce de la TARc chez l'enfant infecté par le VIH permettrait de réduire le réservoir à ses plus bas niveaux, menant à un meilleur contrôle de la réplication virale suite à une éventuelle interruption de traitement. Nous avons obtenu des corrélations positives entre la taille du réservoir viral lymphocytaire sanguin du VIH-1 et l'âge de l'initiation de la TARc et l'âge à la suppression virale soutenue (SVS). Les niveaux des réservoirs sont négativement corrélés à la proportion de la vie sous TARc efficace et à la proportion de la vie sous SVS et au compte de lymphocytes T CD4+. Nous avons montré également qu'un traitement initié précocement dans les premiers six mois de vie serait un facteur de prédictions d'une suppression virale plus rapide et plus soutenue. Nos résultats confirment que l'initiation précoce de la TARc et le maintien à long terme de la suppression virale stable sont des facteurs clés conduisant à une taille limitée du réservoir viral. Par ailleurs, nous démontrons pour la première fois que la taille du réservoir inductible du VIH-1 mesurée dans les lymphocytes T CD4+ du sang périphérique après stimulation avec un analogue de prostratine corrèle significativement avec celle mesurée en ADN proviral. Ainsi, nous avons validé une nouvelle technique de mesure de réservoir inductible qui est rapide et moins coûteuse et surtout requiert un faible volume de sang donc semble très prometteuse pour des études sur le VIH-1 pédiatrique.

Mots-clés : Réservoir VIH-1, enfants, traitement précoce, suppression virale, ADN proviral, ARN inductible, prostratine.

Abstract

The major barrier to eradicating HIV is the existence of cellular reservoirs of HIV, which escape the treatment and immune response of the host. This reservoir is established very early in the infection, typically leading to the destruction of a large number of CD4+ T cells. However, a small proportion of these cells return to quiescent state after integrating the viral genome. The size and evolution of the reservoir in adults have been well understood. However, we know less about the size and distribution of the HIV reservoir, and the impact of early initiation of combination antiretroviral therapy (cART) on it in the infant population. Our study is a part of the Early Pediatric Initiation Canada, Child Cure Cohort (EPIC₄); a prospective, multicenter study, which enrolled 221 vertically HIV-1 infected children in nine Canadian pediatric centers. We hypothesize that very early initiation of cART in HIV-infected children would reduce the reservoir to its lowest levels, leading to better control of viral replication following a possible interruption of treatment. A strong positive correlation was observed between reservoir size in peripheral blood and both the age at initiation of cART and the age at which sustained viral suppression (SVS) was achieved. We found a strong negative correlation between the size of the viral reservoir and the proportion of life spent on effective cART or the proportion of life with SVS and CD4+ T lymphocytes count. This study shows that starting cART within 6 months from birth is a predictor of faster and more sustained virological suppression in infants. Our findings suggest that early cART initiation in infants and long-term viral suppression are key factors leading to limited viral reservoir size. Furthermore, we established for the first time that the size of the inducible HIV-1 reservoir in peripheral blood CD4+ T lymphocytes of children, quantified by the prostratin analogue stimulation test, correlates with the size obtained using proviral DNA measurement. Thus, we have validated a new inducible reservoir measurement technique that is fast, less expensive, and, importantly requires a lower blood volume. This assay could be very promising for evaluating inducible HIV-1 reservoirs in pediatric HIV-1 studies.

Keywords : HIV reservoir, infants, early treatment, virological suppression, HIV-1 DNA, inducible RNA, prostratin.

Table des matières

Résumé.....	i
Abstract.....	ii
Table des matières.....	iii
Liste des tableaux.....	vi
Liste des figures.....	vii
Liste des abréviations.....	ix
Remerciements.....	xiii
INTRODUCTION.....	1
1. Le VIH.....	2
1.1. Incidence et modes de transmission.....	2
1.2. Structure virale, organisation génomique et cycle de réplication.....	3
1.2.1. Structure virale.....	3
1.2.2. Organisation génomique.....	4
1.2.3. Cycle de réplication.....	5
1.3. La pathogenèse du VIH-1.....	7
1.4. Le traitement antirétroviral combiné.....	9
2. Le réservoir du VIH.....	10
2.1. Établissement du réservoir du VIH dans les sous-populations lymphocytaires T CD4 ⁺	11
2.1.1. Infection des sous populations lymphocytaires T CD4 ⁺	11
2.1.2. Mécanismes moléculaires de la latence.....	13
2.2. La quantification du réservoir.....	16
2.2.1. Essais basés sur la PCR.....	16
2.2.2. Essais basés sur la culture cellulaire.....	18
2.2.3. Essais de nouvelle génération.....	19
3. Impact de l'initiation précoce du traitement sur les réservoirs du VIH-1.....	23
3.1. Cinétique de la décroissance virale.....	23

3.2. Impact du traitement précoce sur la taille et la stabilité des réservoirs de VIH-1 mesurés dans les PBMC.....	25
3.3. Effet du traitement précoce sur la distribution du réservoir dans les différentes sous-populations lymphocytaires	28
4. Rationnel de l'étude EPIC ⁴ (Early Pediatric Initiation, Canada Child Cure Cohort Study). 31	
DEUXIÈME CHAPITRE : MATÉRIEL ET MÉTHODES	34
1. Cohorte EPIC ⁴	35
2. Isolation et conservation des cellules mononucléées du sang périphérique	35
3. Quantification de l'ADN proviral dans les PBMC	36
3.1. Préparation des culots cellulaires.....	36
3.2. Quantification de l'ADN proviral (Figure 11).....	36
4. Stimulation des lymphocytes T CD4 ⁺ avec un analogue de la prostratine.....	39
4.1 Isolement des Lymphocytes T CD4 ⁺	39
4.2 Stimulation des LTCD4 ⁺ à la prostratine.....	39
4.3 Quantification des surnageants de stimulation à la prostratine.....	39
5. Graphiques et statistiques	40
6. Définitions.....	40
TROISIÈME CHAPITRE : RÉSULTATS	42
1. Quantification et évaluation de l'impact des traitements précoces sur les réservoirs lymphocytaires sanguins.....	43
1.1. Caractéristiques de la population étudiée	43
1.2. Corrélations entre l'âge de l'initiation de la TARc et les paramètres: PLEC, PLUS, cPLEC et cPLUS.....	44
1.3. Corrélations entre la taille du réservoir et les paramètres: PLEC, PLUS, cPLEC et cPLUS	45
1.4. Impact du moment de l'initiation sur la taille du réservoir viral lymphocytaire sanguin	47
1.4.1. Stratification et caractéristiques des groupes	47

1.4.2. Corrélations entre la taille du réservoir et l'âge d'initiation de la TARc.....	50
1.4.3. Corrélations entre la taille du réservoir et l'âge à la SVS.....	53
1.5. Corrélations entre la taille du réservoir et les comptes de CD4 ⁺ des patients.....	53
1.6. Corrélations entre la taille du réservoir mesurée en ADN proviral total et ARN inducible après stimulation à la prostratine	54
QUATRIÈME CHAPITRE : DISCUSSION.....	56
CINQUIÈME CHAPITRE : CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	63
Bibliographie.....	66
ANNEXE: Clinical correlates of HIV-1 DNA and inducible HIV-1 RNA reservoirs in peripheral blood in children with perinatally acquired HIV-1 infection with sustained virologic suppression for at least 5 years.	i

Liste des tableaux

Tableau 1 : Techniques de mesure du réservoir du VIH-1	22
Tableau 2 : Caractéristiques de base des participants.....	43
Tableau 3 : Les caractéristiques de base des participants par groupe.....	48

Liste des figures

Figure 1 : Représentation schématique de la particule virale de VIH-1 mature.	3
Figure 2 : Organisation génomique du VIH-1.	4
Figure 3 : Cycle de réplication du VIH-1.	5
Figure 4 : Évolution du taux des LTCD4 (en bleu) et de la charge virale (en rouge) au court de l'infection au VIH-1.	8
Figure 5 : Évolution de la virémie avant, pendant et après le TARc et évidence clinique de l'existence du réservoir VIH.	10
Figure 6 : Établissement et maintien du réservoir du VIH-1.	12
Figure 7 : Les quatre phases de la décroissance de la production virale après initiation de la TARc et les populations cellulaires responsables de la production des virions à chaque phase.	24
Figure 8 : Modélisation de la régression du niveau de l'ADN viral, en fonction du moment de l'initiation du traitement.	27
Figure 9 : La distribution du réservoir dans les différentes sous-populations Lymphocytaires CD4 chez des participants traités en phase chronique versus des participants traités en primo-infection.	29
Figure 10 : Rationnelle de l'étude EPIC4.	33
Figure 11 : Principe de la technique basée sur la PCR utilisée pour mesurer l'ADN total du VIH.	36
Figure 12 : Positions des amorces et des sondes utilisées.	38
Figure 13 : présentation schématique des paramètres PLEC et PLUS.	41
Figure 14 : PLEC (a), cPLEC (b), PLUS (c) et cPLUS (d) en fonction de l'âge à l'initiation de la TARc.	44
Figure 15 : Taille du réservoir viral en ADN proviral mesurée par real-time et exprimée en copies / 10 ⁶ PBMC, en fonction de: PLEC (a), cPLEC (b), PLUS (c) et cPLUS (D).	46
Figure 16 : Taille du réservoir viral inductible mesurée en Log 10 de copies d'ARN viral produit par les LT CD4 stimulés par un analogue de la prostratine, fonction de: PLEC (a), cPLEC (b), PLUS (c) et cPLUS (D).	47

Figure 17 : Comparaison de la taille du réservoir lymphocytaire sanguin chez les enfants traités avant 6 mois d'âge (groupe A) Versus enfants traités après 6 mois d'âge (groupe B)..... 51

Figure 18 : Taille du réservoir lymphocytaire sanguin en fonction de l'âge de l'initiation de la TARc effective..... 52

Figure 19 : Taille du réservoir lymphocytaire sanguin en fonction de l'âge de la SVS. 53

Figure 20 : Taille du réservoir lymphocytaire sanguin en fonction du compte courant des LTDC4+..... 54

Figure 21 : Corrélation de la taille du réservoir viral mesurée en ADN proviral dans les PBMC en ARN viral inductible après stimulation à la prostratine dans les LT CD4+. 55

Liste des abréviations

ADN:	Acide désoxyribo nucléique
APOBEC:	APOlipoprotein B mRNA-editing enzyme catalytic polypeptide
ARN:	Acide riboNucléique
BCL6:	B-cell lymphoma 6 protein
CA:	Capside
CCR5:	C-C chemokine receptor type 5
CD25:	interleukin 2 receptor alpha
CD28:	Cluster of differentiation 28
CD69:	Cluster of differentiation 69
CMH:	Complexe majeur d'histocompatibilité
CXCR4:	Chemokine (C-X-C motif) receptor 4
ddPCR:	Droplet digital PCR
DMSO:	Diméthylsulfoxyde
EDTA:	Acide éthylène diamine tétraacétique (Ethylenediaminetetraacetic acid)
ELISA:	Enzyme-linked immunosorbent assay
Env:	Précurseurs polyprotéiques de glycoprotéines d'enveloppe
EPIC4:	Early pediatric initiation canada child cure cohort study
FISH:	Fluorescence in situ hybridization
Gag:	Précurseurs polyprotéiques de protéines associées à l'ARN et de la capsid
GALT:	Système lymphoïde associé à l'intestin (Gut associated lymphoid tissue)
Gp120:	Glycoprotéine d'enveloppe du VIH-1
Gp41:	Sous unité de la gp120 du VIH-1
HAART:	Highly active antiretroviral therapy
HDAC :	histones déacétylases
HLA:	Antigènes des leucocytes humains
IL:	Interleukine
INNTI:	Inhibiteur non-nucléosidique de la transcriptase inverse
INTI:	Inhibiteur nucléosidique de la transcriptase inverse

IP:	Inhibiteur de protéase
ITI:	Inhibiteur d'intégrase
IUPM:	Infectious units per million
LRA:	Latency reversing agents
LT CD4:	Lymphocyte T CD4
LTR:	Long terminal repeat
Nef:	Negative regulator factor
NF-kB:	Nuclear factor-kB
NPC:	Nuclear pore complex
P24 :	Protéine p24 du VIH
PBMCs:	Cellules mononuclées du sang périphérique
PBS:	Phosphate buffered saline
PCR:	Polymérase chain reaction
PD-1:	Programmed cell death-1
PHA:	Phytohemagglutinin
PIC:	Complexe de préintégration
PKC:	Protéine kinase C
PMA :	Phorbol 12-myristate 13-acétate
Pol:	Gène codant pour la polymérase
PR:	Protéase
p-TEFb:	Positive transcription elongation factor b
QVOA:	Quantitative viral outgrowth assay
Rev:	Regulator of expression of virion proteins
RT:	Transcriptase inverse
SCA:	Single copy assay
Sida:	Syndrôme d'immunodéficience acquise
SIV :	Virus de l'immunodéficience simienne
STCM:	Cellule souche T mémoire (Stem T central memory cell)
SVS:	Suppression virale soutenue
TAR:	Trans-activating response element
TARc:	Thérapies antirétrovirales combinées

TAT:	Trans-activator of transcription
TCM:	Lymphocyte T mémoire central (Central-memory T lymphocyte)
TEM:	Lymphocyte T mémoire effecteur (Effector-memory T lymphocyte)
Tfh :	T folliculaires auxiliaires
TILDA:	tat/rev induced limiting dilution assay
TN:	Lymphocyte T naïf (Naive T lymphocyte)
TTM:	Lymphocyte T mémoire transitionnel (Transitional memory T lymphocyte)
Vif:	Virion infectivity factor
VIH:	Virus de l'immunodéficience humaine
VIH-1:	Virus de l'immunodéficience humaine de type 1
Vpr:	Viral protein R
Vpu:	Viral protein U

À mes parents

Remerciements

Je tiens tout particulièrement à remercier mon directeur de recherche, Dr Hugo Soudeyns, qui m'a donné la chance de faire partie de son équipe de recherche. Je le remercie pour la confiance, la patience, son incroyable gentillesse, son soutien et la générosité qu'il m'a accordée.

Je remercie également tous les membres de notre laboratoire pour les conseils et les discussions partagés. Je remercie spécialement Martine Cathy et Doris Ransy d'avoir répondu à mes questions et je les remercie pour les mots d'encouragement.

Je remercie le gouvernement Tunisien qui a financé mes études au Canada. J'en serai infiniment reconnaissante.

Je remercie mes parents et mes sœurs, pour leur amour inconditionnel, leur patience et leur soutien. C'est grâce à eux que je suis ici aujourd'hui.

PREMIER CHAPITRE :
INTRODUCTION

1. Le VIH

1.1. Incidence et modes de transmission

Cela fait plus de trois décennies que les premiers cas de syndrome d'immunodéficience acquise (sida) ont été identifiés (Barré-Sinoussi et al., 1983; Gallo et al., 1983). Depuis, des efforts de recherches se sont consacrés au développement des stratégies thérapeutiques et préventives de cette infection. Malgré les progrès considérables réalisés, l'infection au virus de l'immunodéficience humaine (VIH) reste une infection chronique incurable, qui en absence de traitement se manifeste par le sida, caractérisé par une immunosuppression engendrant des infections opportunistes fatales et des cancers (Deeks et al., 2015). En 2017, le nombre total de personnes vivant avec le VIH-1 était de 36.9 millions, dont 1.8 millions d'enfants de moins de 15 ans avec 160,000 cas d'enfants nouvellement infectés (UNAIDS 2018). La transmission verticale (de la mère à l'enfant) est la première cause d'infection chez les enfants. Et en absence de traitement, l'évolution de la maladie chez l'enfant infecté est beaucoup plus rapide que celle observée chez l'adulte, avec des charges virales maximales et des set-points viraux plus élevés durant la première année de vie, entraînant la mort de 50% des enfants infectés et non traités avant l'âge de deux ans (Shearer et al., 1997).

Plus d'un million de personnes meurent chaque année suite aux maladies liées au sida. Parmi les personnes infectées, environ la moitié seulement ont accès aux thérapies antirétrovirales combinées (TARc). Les TARc permettent de réduire de façon considérable la charge virale plasmatique, souvent jusqu'à un niveau indétectable (<50 copies / mL). Les sujets sont alors peu susceptibles de transmettre le virus (Natarajan et al., 1999; Cohen et al., 2016). Malgré cette progression, le taux annuel des nouvelles infections est de 1,8 million et reste loin des objectifs du programme commun des Nations Unies sur le VIH / sida (ONUSIDA), qui vise à diminuer ce nombre à moins de 500,000 infections par an d'ici 2020.

La transmission du VIH-1 se fait par exposition directe à des fluides organiques contaminés (sang, sperme, sécrétions vaginales, lait maternel...). Mais la voie de contamination la plus répandue est la voie sexuelle. La contamination peut survenir également par transmission sanguine suite au partage d'aiguilles contaminées chez les toxicomanes ou lors de transfusions

sanguines. Enfin, la transmission verticale de la mère à l'enfant peut se produire à 3 stades différents; en utero, pendant le travail, ou suite à l'allaitement (Maartens et al., 2014).

1.2. Structure virale, organisation génomique et cycle de réplication

1.2.1. Structure virale

Le VIH-1 est un lentivirus de la famille des Retroviridae. Son information génétique est codée sous forme d'ARN qui est ensuite rétrotranscrit en ADN double brins avant d'intégrer le génome de la cellule hôte.

Les particules virales du VIH-1 (Figure 1) sont de forme sphérique d'environ 100 à 120 nm de diamètre. Elles sont entourées d'une bicouche lipidique provenant de la membrane de la cellule hôte et dans laquelle deux sortes de glycoprotéines virales d'enveloppe (Env) sont insérées: les glycoprotéines de surface nommées gp120 et les glycoprotéines transmembranaires nommées gp41. Le complexe gp120/gp41 se présente sous forme de trimère (Mao et al., 2012). Sous la bicouche lipidique, on trouve la matrice qui est constituée de la protéine p17 et associée à une enzyme virale, la protéase (p10). Vient ensuite la capside, de forme conique, composée de la protéine p24, et qui renferme l'ARN viral associé à la protéine de nucléocapside (p7) formant un complexe ribonucléoprotéique. Ce dernier renferme aussi des enzymes virales essentielles: la transcriptase inverse et l'intégrase (Ganser-Pornillos et al., 2008).

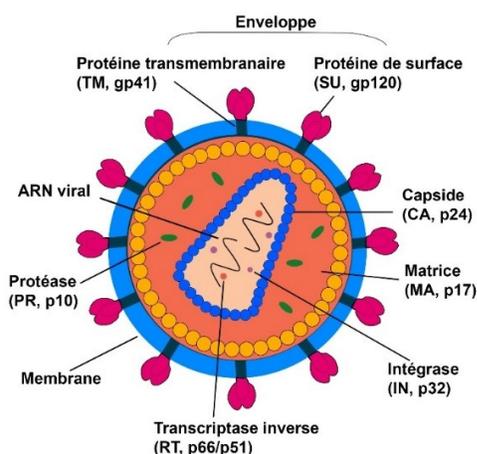


Figure 1 : Représentation schématique de la particule virale de VIH-1 mature (adapté de Ganser-Pornillos et al., 2008).

1.2.2. Organisation génomique

Le génome du VIH-1 est formé de deux copies d'ARN simple brin, d'une longueur d'environ 10 kpb. Il est flanqué entre les deux séquences identiques nommées LTR (longues répétitions terminales) permettant à l'ADN viral de s'intégrer dans le génome de la cellule hôte grâce à leurs sites d'intégration. Contrairement aux autres rétrovirus qui n'expriment que 3 gènes principaux (*env*, *gag* et *pol*), le génome du VIH compte 9 cadres de lecture encodant 16 protéines virales (figure 2).

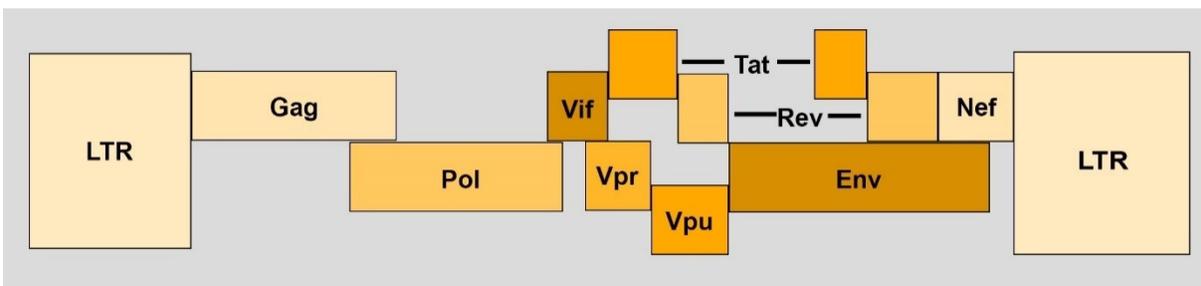


Figure 2 : Organisation génomique du VIH-1 (adapté de Fanales-Belasio et al., 2010).

Les trois gènes principaux encodent les protéines de structure. En effet, le gène *gag* (group specific antigen) est traduit en précurseur polyprotéique Pr55Gag, qui sera clivé par la protéase en protéine de la matrice, capsid et nucléocapsid. Le gène *pol* (polymérase) est à son tour traduit en long précurseur polyprotéique Pr160Gag-pol, qui, une fois clivé par la protéase, donne les enzymes; transcriptase inverse, protéase et intégrase. Quant à lui, le gène *env*, codant le précurseur gp160, sera clivé en glycoprotéines membranaires gp120 et gp41 (Greene et Peterlin., 2002; Freed., 2001)

Le génome du VIH-1 est pourvu également de deux gènes de régulation. Le gène *tat* (transactivator of transcription) code pour la protéine Tat qui induit la transcription du génome viral à partir du 5' LTR. Le gène *rev* (régulation of virion expression) produit la protéine Rev requise pour l'exportation d'ARN viral non épissé du noyau vers le cytoplasme (Greene et Peterlin, 2002; Freed, 2001).

Le génome du VIH-1 code également pour des protéines auxiliaires (Vif, Vpr, Vpu et Nef) (Anderson et Hope, 2003). La protéine Vif (viral infectivity factor) joue un rôle dans l'infectiosité du virus, en permettant de contourner l'effet du facteur de restriction APOBEC3G

(Marin et al., 2003). La protéine Vpr (viral Protein R) participe au transport nucléaire du complexe de préintégration (PIC) vers le noyau cellulaire, mais favorise aussi la réplication en induisant un arrêt du cycle cellulaire en phase G2. La protéine Vpu (viral protein U) régule négativement l'expression de CD4 à la surface des cellules infectées, augmentant ainsi la libération des virions (Willey et al., 1992). Vpu régule également à la baisse les facteurs de restriction tetherin / BST2 à la surface d'une cellule infectée (Van Damme et al., 2008). Finalement, la protéine Nef, la plus immunosuppressive des protéines accessoires, est indispensable à la réplication. Nef réduit l'expression de plusieurs récepteurs essentiels au bon fonctionnement du système immunitaire, tels que CD4 et le CMH I, donc facilite l'évasion immunitaire des cellules T CD8⁺ spécifiques au virus et favorise le bourgeonnement des virions à la surface cellulaire (Anderson et Hope, 2003; Greene et Peterlin, 2002).

1.2.3. Cycle de réplication

Dans le but de mieux comprendre la problématique de notre étude, en lien avec l'établissement du réservoir viral, il est important de passer en revue les mécanismes de réplication du VIH-1 (figure 3).

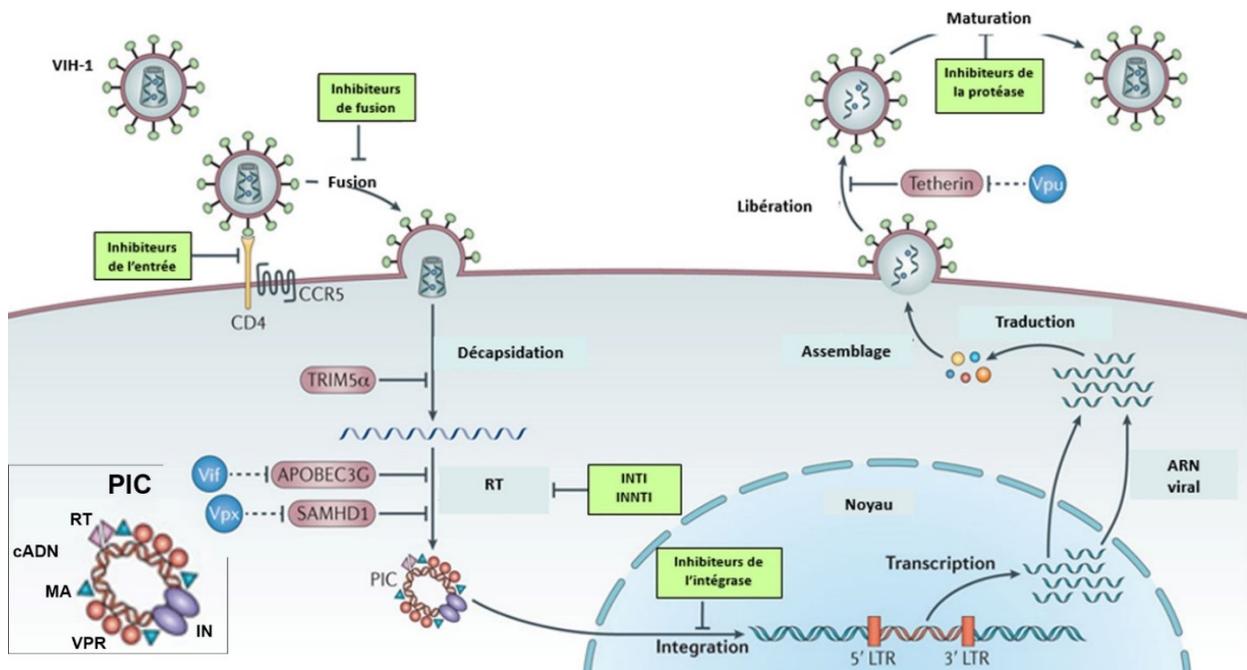


Figure 3 : Cycle de réplication du VIH-1.

L'infection commence avec l'interaction entre les gp120 et les récepteurs cellulaires permettant la fusion membranaire suivie du relâchement de la nucléocapside dans le cytoplasme. Les brins de l'ARN viral sont rétro-transcrits en ADN double brins par la transcriptase inverse. Le complexe de pré-intégration PIC est ensuite dirigé vers le noyau, et l'ADN viral intègre le chromosome de l'hôte par l'action de l'intégrase. L'ADN proviral utilise la machinerie cellulaire pour être transcrit en différents ARNm qui seront traduits en différentes protéines. Les protéines et l'ARN s'assemblent dans des particules virales immatures et bourgeonnent à la membrane cellulaire. La protéase vient ensuite cliver les précurseurs Gag et Gag-Pol générant des particules virales infectieuses (adapté de Barré-Sinoussi et al., 2013).

Le VIH-1 infecte les cellules immunitaires exprimant le récepteur CD4, donc principalement les lymphocytes T CD4⁺ auxiliaires ainsi que les cellules myéloïdes, notamment les macrophages (Freed., 2001). L'infection est initiée par la liaison de la glycoprotéine gp120 de l'enveloppe virale au récepteur CD4 (Dalglish et al., 1984; Klatzmann et al., 1984) et ensuite à un co-récepteur appartenant à la famille des récepteurs de chimiokines, CCR5 ou CXCR4 (Dragic et al., 1996; Feng et al., 1996). L'affinité pour l'un ou l'autre de ces corécepteurs définit le tropisme viral, on parle de virus de type R5 et de virus de type X4, ou de virus "dual R5X4" utilisant les deux co-récepteurs (Berger et al., 1999). Suite à la formation du complexe CD4/gp120/corécepteur, la gp41 adopte une conformation plus relâchée, permettant la libération de son peptide de fusion. Le peptide de fusion va s'ancrer à la membrane de la cellule hôte pour créer un pore de fusion via lequel le virus va éjecter sa capsid dans le cytoplasme cellulaire (Richard et al., 2018). L'entrée de la capsid dans le cytoplasme est suivie de sa dégradation, libérant ainsi son contenu dans le cytoplasme, soit les deux brins d'ARN et les enzymes virales (Arhel., 2010). Par la suite, l'ARN du VIH sera rétrotranscrit en ADN double brin grâce à la transcriptase inverse. Se forme alors le PIC, qui résulte de l'assemblage de l'ADN viral avec l'intégrase, les protéines Vpr, la RT et la matrice (Hu et Hughes, 2012). La protéine Vpr dirige le complexe vers le noyau. Rendu au noyau et sous l'action de l'intégrase, l'ADN viral va intégrer le génome de la cellule hôte sous forme de provirus (Craigie et Bushman, 2012; Greene et Peterlin, 2002). C'est cette étape du cycle viral qui constitue le principal obstacle à l'éradication de l'infection.

La transcription de l'ADN proviral est initiée à partir du promoteur viral dans le LTR 5' et utilise l'ARN polymérase II cellulaire. Dans un premier temps, ce sont les ARNm épissés courts codant pour les protéines Tat, Rev et Nef qui sont synthétisés et traduits. Tat joue un rôle majeur dans la régulation de la transcription. Cette protéine favorise l'élongation de l'ARNm en se liant à la séquence Tar de l'ARN viral (Briggs et al., 2009). Suite à quoi est entreprise la transcription des ARNm non épissés, encodant les précurseur Gag, Gag-Pol et Env, et les ARNm partiellement épissés encodant les protéines dites accessoires, Nef, Vif, Vpr et Vpu (Briggs et al., 2009; Greene et Peterlin, 2002). Rev assure l'exportation de ces ARNm vers le cytoplasme pour y être traduits (Fernandes et al., 2012). Une fois la traduction complétée, les protéines virales s'assemblent et s'associent à l'ARN viral, formant ainsi les virions immatures qui vont bourgeonner à la membrane plasmique (Comas-Garcia et al., 2016). Les protéines précurseurs Gag et Gag-Pol vont subir par la suite un clivage protéolytique par la protéase virale, générant des particules virales matures infectieuses (Sundquist et Krausslich., 2012).

1.3. La pathogenèse du VIH-1

Pendant la première phase de l'infection au VIH, dite phase aiguë, on assiste à une diminution drastique du nombre de lymphocytes T CD4⁺ consécutive à l'effet cytopathique de la réplication virale. Concomitamment, la charge virale atteint un pic spectaculaire, pouvant aller jusqu'à 10⁷ copies d'ARN viral par ml de plasma (Douek et al., 2008). Au cours des premières semaines, la réponse immunitaire adaptative se déclenche pour générer les cellules T CD8⁺ cytotoxiques et les anticorps dirigés contre les cellules infectées (Demers et al., 2016). La production d'anticorps anti-VIH-1 est cliniquement définie comme séroconversion. Parallèlement au développement de ces réponses immunitaires, la charge virale diminue jusqu'à atteindre ce qu'on appelle le "viral setpoint", mais n'arrive pas à éliminer complètement le virus. Ce point marque le passage de la phase aiguë à la phase chronique (Mellors et al., 1997). Durant cette phase s'établissent très précocement les réservoirs viraux suite essentiellement à l'infection des lymphocytes T CD4⁺ mémoires (Eisele and Siliciano, 2012).

La deuxième phase, dite encore asymptomatique (d'une durée de 2 à 8 ans en absence de traitement), est caractérisée par une charge virale relativement stable. Cependant, les lymphocytes T CD4⁺ sont lentement détruits (Okoye et Picker., 2013). Cette déplétion est due à

plusieurs facteurs, entre autres à l'activation immunitaire chronique induisant la mort cellulaire suite à l'épuisement des métabolismes cellulaires. Un des mécanismes responsables de cette activation immunitaire soutenue est la translocation microbienne au niveau du tractus gastro-intestinal. En effet, lors de la primo-infection, la destruction massive des lymphocytes T CD4⁺ au niveau de la muqueuse gastro-intestinale (GALT) altère l'intégrité de la barrière gastro-intestinale et crée des portes d'entrée par lesquelles les antigènes pénètrent dans l'organisme. Ainsi, cet état d'inflammation soutenue est idyllique pour la prolifération et l'activation de nouveaux lymphocytes T CD4⁺, cibles pour le VIH (Reid et al., 2018). La progression de la maladie est associée également à la destruction des tissus lymphoïdes et à l'épuisement du thymus (Fauci., 1996).

Lorsque le taux des lymphocytes T CD4⁺ atteint des niveaux plus bas que 200 cellules/μl, on passe à la troisième phase de la maladie: le stade sida. Ce stade est marqué par une augmentation accrue de la virémie et une chute draconienne du nombre des lymphocytes T CD4⁺. Cette insuffisance immunitaire sévère rend l'individu infecté extrêmement vulnérable et sensible aux infections opportunistes qui conduiront ultimement à la mort (Douek et al., 2008).

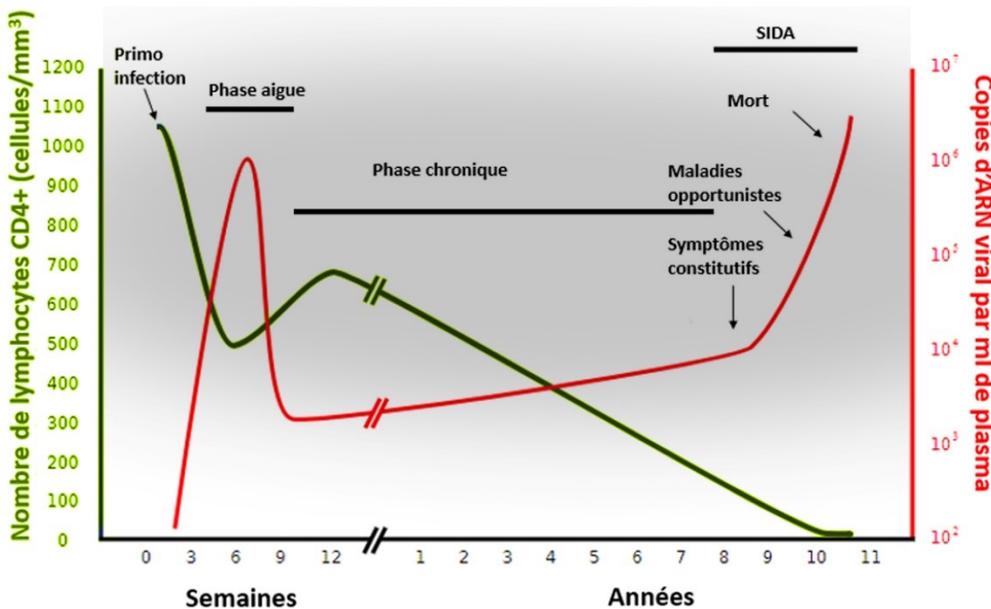


Figure 4 : Évolution du taux des lymphocytes T CD4⁺ (en bleu) et de la charge virale (en rouge) au cours de l'infection au VIH-1. (adapté de Fanales-Belasio et al., 2010)

1.4. Le traitement antirétroviral combiné

Avec le développement de thérapies antirétrovirales (ARV) inhibant la réplication virale et restaurant les réponses immunitaires, le VIH est passé d'une infection létale à une infection chronique nécessitant des traitements pour le restant de la vie (Palella et al., 1998). À présent, une trentaine de molécules antirétrovirales ont été développées, toutes visant à perturber des étapes critiques du cycle de réplication virale (figure 3). Ainsi, on distingue six classes pharmacologiques d'ARV, soit : les inhibiteurs nucléosidiques de la transcriptase inverse (INTI), les inhibiteurs non nucléosidiques de la transcriptase inverse (INNTI), les inhibiteurs de transfert de brin de l'intégrase (INSTI), les inhibiteurs de la protéase (IP), ainsi que des inhibiteurs de fusion (IF) et les inhibiteurs d'entrée (antagonistes du corécepteurs CCR5) (Engelman et Cherepanov., 2012).

En 1996, l'introduction des TARc, appelées aussi HAART, (« Highly Active Antiretroviral Therapy »), s'est avérée très efficace et avait auguré l'espoir d'éradiquer le VIH (Perelson et al., 1997). En raison de la nature hautement mutagène du virus, le VIH-1 peut échapper à une monothérapie en quelques jours. Par conséquent, la TARc standard actuelle est une association de trois antirétroviraux qui minimise considérablement la probabilité de développer des résistances aux médicaments (Hummer et al., 1996). En règle générale, la TARc comporte deux INTI en association avec une troisième molécule. La TARc inhibe activement la réplication virale, réduit la virémie en dessous des limites détectables cliniquement, rétablit le nombre de lymphocytes T CD4⁺, réduit considérablement la morbidité due à l'infection au VIH-1 et augmente surtout l'espérance de vie des personnes infectées proche de la normale de la population générale (Arts et Hazuda, 2012). Malheureusement, l'interruption du traitement est invariablement accompagnée d'un rebond viral (figure 5) qui révèle l'existence du réservoir viral quiescent et ruinant ainsi l'espoir de l'éradication complète du virus (Finzi et al., 1997; Kulpa et Chomont, 2015).

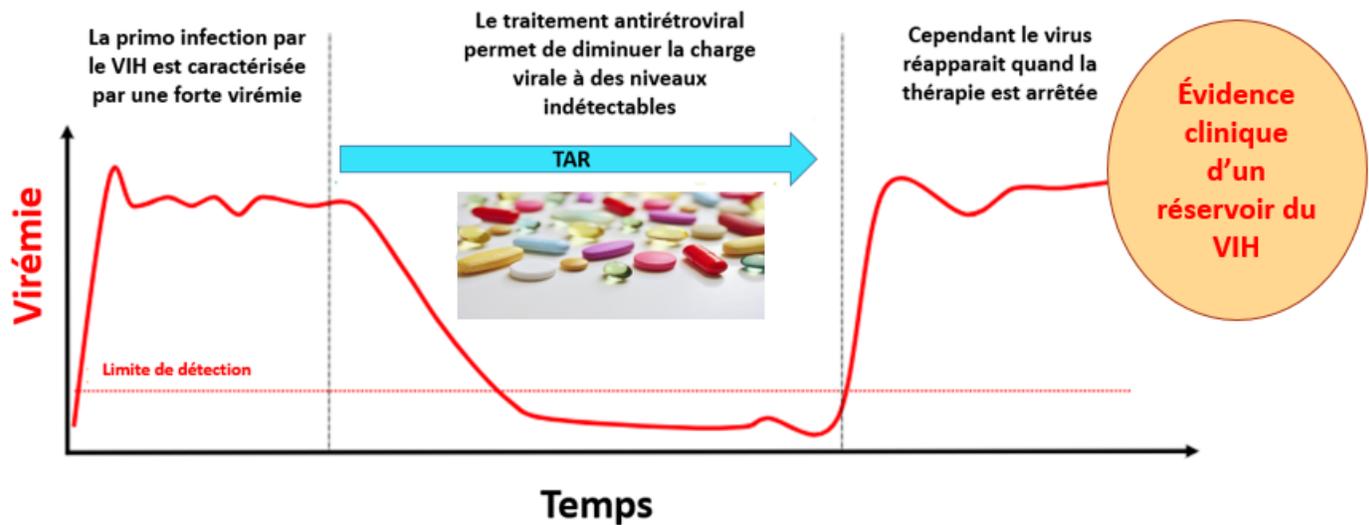


Figure 5 : Évolution de la virémie avant, pendant et après le TARc et évidence clinique de l'existence du réservoir VIH (adapté de Kulpa et Chomont, 2015).

2. Le réservoir du VIH

L'ensemble de toutes les cellules infectées par le VIH chez un individu infecté forment le réservoir viral. Dans le cas d'une multithérapie suppressive TARc, le réservoir est estimé de 0,1 à 1 cellules infectées par million de cellules T CD4⁺, indiquant qu'environ un million de cellules au total seraient infectées chez un individu (Eriksson et al., 2013). Le réservoir latent du VIH-1 a été initialement identifié dans une sous population de lymphocytes T CD4⁺ quiescents, ayant intégré l'ADN du VIH-1 dans leurs génomes chez des individus infectés et non traités (Chun et al., 1995). Les lymphocytes T CD4⁺ quiescents sont caractérisés par un manque d'expression des marqueurs d'activation des cellules T soient CD25, CD69 et HLA-DR (Wong et al., 1997). Autrement, ce sont des cellules qui hébergent des formes virales compétentes pour la réplication, mais avec une cinétique de renouvellement plus lente que celle des formes virales se répliquant activement. La transcription et la réplication du virus sont inductibles lors de stimulations suffisantes des cellules T (Blankson et al., 2002; Persaud et al., 2003)

Plusieurs études ont démontré que le réservoir du VIH-1 est principalement enrichi en lymphocytes T CD4⁺ quiescents (Chomont et al., 2009), mais aussi d'autres cellules telles que

les macrophages qui jouent également un rôle dans le maintien de la persistance du VIH-1 (Aquaro et al., 2002). Les cellules T folliculaires auxiliaires (Tfh), définies comme des cellules T CD4⁺/ PD-1⁺/ CXCR5⁺/ Bcl-6⁺, dans le sang et les ganglions lymphatiques, participent de même à l'établissement du réservoir viral (Chun et al., 2005). La forme la plus étudiée du réservoir du VIH-1 est les lymphocytes T CD4⁺.

2.1. Établissement du réservoir du VIH dans les sous-populations lymphocytaires T CD4⁺

2.1.1. Infection des sous populations lymphocytaires T CD4⁺

Suite à une infection par le VIH, les lymphocytes T CD4⁺ naïfs matures qui sont activés entrent dans une phase d'expansion clonale durant laquelle ils s'amplifient et se différencient en lymphocytes T CD4⁺ effecteurs. Cette phase est suivie d'une phase de contraction, durant laquelle les cellules meurent par apoptose. Seule une petite fraction (environ 5 à 10%) survivra (Figure 6.a). Ce sont les lymphocytes T CD4⁺ mémoires. Lors d'une nouvelle stimulation, ces derniers répondent d'une manière plus rapide et plus forte (Persaud et al., 2003; Sallusto et al., 1999). C'est ce principe qui est utilisé dans le développement des vaccins (Kaech et al., 2009). La population lymphocytes T CD4⁺ est très hétérogène. On distingue selon leur état de différenciation : lymphocytes T naïfs (TN) et les autres souches mémoires comme les T stem cell memory cell (TSCM), les cellules T mémoires centrales (TCM), les cellules T mémoires transitionnelles (TTM) et les cellules T mémoires effectrices (TEM) (Sallusto et al., 1999). La taille et la diversité de ce pool lymphocytaire sont finement régulées par les cytokines homéostatiques; soit l'IL-7 pour les TN et les TEM, et les IL-7 et -15 pour les TCM (Zhu et al., 2009). La contribution des différentes sous populations au réservoir sera discutée au chapitre 3.

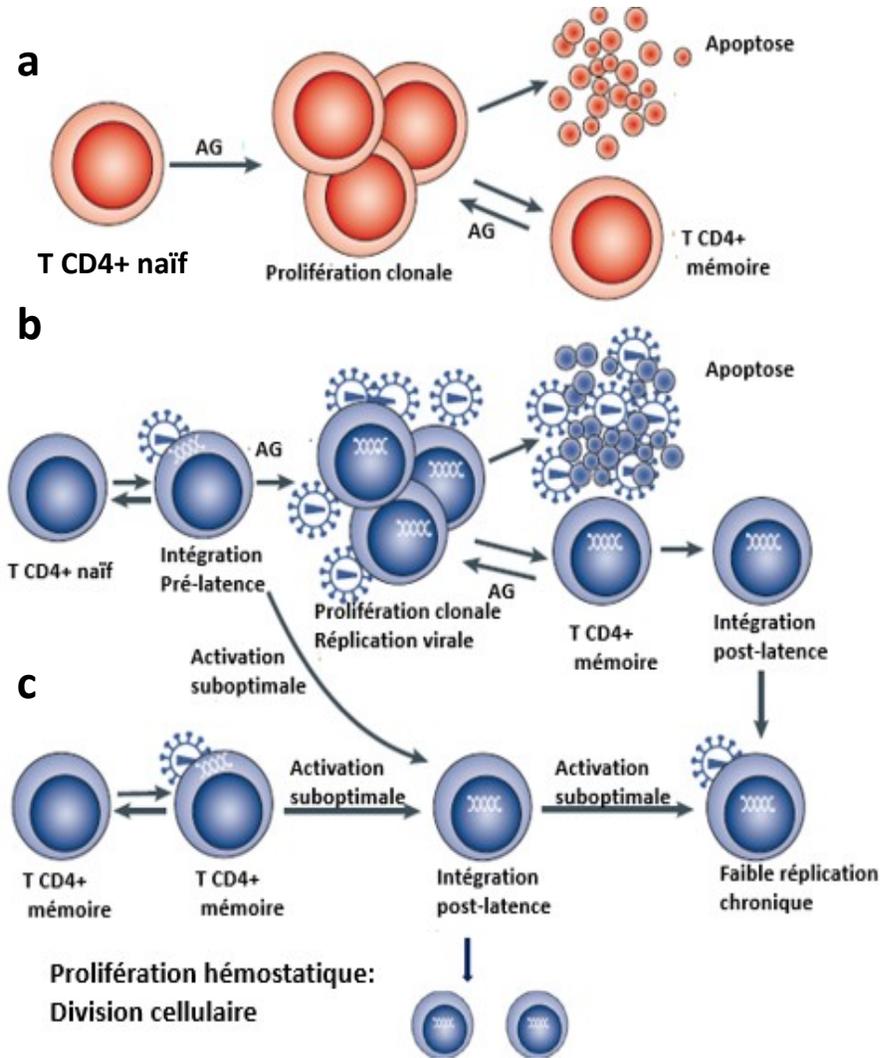


Figure 6 : Établissement et maintien du réservoir du VIH-1. **a.** Après l’initiation par un antigène, les CD4+naïfs se différencient en cellules effectrices. Ces cellules évoluent par la suite soit en apoptose ou en cellules CD4+ mémoires. **b.** La latence pré-intégration a lieu lorsque le virus infecte un lymphocyte TCD4+ naïf ou bien mémoire. L’ADN viral se trouve sous une forme non intégrée et instable ne permettant pas la persistance à long terme du réservoir viral. L’activation de ces cellules permet l’intégration de l’ADN viral dans le génome cellulaire et la production de virions. Après la phase de contraction clonale, ces cellules évoluent en cellules quiescentes en ayant intégrée le provirus viral. C’est l’intégration post-latence. **c.** La stabilité de la cellule mémoire CD4+ est maintenue naturellement grâce à la prolifération homéostatique, ce qui permet aux provirus du VIH-1 dans les cellules infectées de se renouveler en l'absence

de réplication virale. La prolifération homéostatique est induite par l'interleukine-2 (IL-2) lorsque les taux de lymphocytes circulants diminuent (adapté de Coiras et al., 2009).

Les lymphocytes T quiescents, naïfs ou mémoire, forment un environnement restrictif à la réplication du VIH-1. En effet, l'expression faible voir absente de CCR5 limite le nombre de cibles disponibles pour le virus. De plus, le pool de nucléotides et les niveaux d'ATP qui sont infimes dans ces cellules entraînent une rétro-transcription inefficace et un import nucléaire du PIC limité (Descours et al., 2012). Rappelons aussi que les lymphocytes T CD4⁺ quiescents expriment le facteur de restriction APOBEC3G sous sa forme active, ce qui interfère avec la transcription inverse du virus (Marin et al., 2003). Vu ces contraintes à l'intégration, les formes non intégrées à la fois linéaires et circulaires, instables et labiles s'accumulent dans les lymphocytes T CD4⁺ quiescents. À ce niveau, on parle de latence préintégrative. Une activation transitoire ou suboptimale de ces cellules est propice à l'intégration du génome viral. Donc, après une stimulation antigénique, une petite portion des cellules évolue en cellules mémoires à très longue vie, tout en conservant le provirus dans leur génome, On parle alors de la latence postintégrative qui est cruciale à la persistance virale à long terme (Figure 6.b) (Chavez et al., 2015; Coiras et al., 2009). Ainsi, le premier mécanisme incriminé dans le maintien à travers le temps du réservoir viral est dû à la biologie des cellules T CD4⁺ quiescentes: leur longue durée de vie (Chun et al., 1997; Brenchley et al., 2004).

Le deuxième mécanisme serait la prolifération homéostatique (Figure 6.c). C'est un processus naturel qui permet la pérennité des cellules mémoires et qui est indépendant de la présentation antigénique (Farber et al., 2014). Les cellules quiescentes maintiennent une réplication résiduelle faible. De la même façon, le petit pool de lymphocytes T CD4⁺ quiescents infectés ayant intégré l'ADN proviral dans leur génome va se renouveler et persister. Ainsi, le réservoir viral est réapprovisionné en permanence, ce qui le rend stable (Bui et al., 2017; Hosmane et al., 2016; Persaud et al., 2003)

2.1.2. Mécanismes moléculaires de la latence

Un des paradoxes de l'infection à VIH est que l'intégration se fait préférentiellement dans des régions transcriptionnellement actives, mais que ce génome peut être silencieux (Schroder et al., 2002). Une fois que le provirus est intégré, la production de nouveaux virions

dépendra de la machinerie cellulaire. Un blocage dans l'une des étapes d'expression du gène peut réprimer la production d'ARN viral, de protéines ou de particules virales du VIH-1. Van der Sluis et ses collaborateurs ont regroupé les mécanismes potentiels participant à l'établissement de la latence en trois groupes; soit des facteurs cellulaires (effet trans), des facteurs viraux (effet cis), ou les des deux à la fois (effet cis/trans).

Effet trans:

Le provirus intégré contient deux LTR identiques en 5'et 3'. Bien que les deux LTR puissent promouvoir la transcription, le LTR 5' sert de promoteur du VIH-1 (Ne et al., 2018). Le LTR contient un activateur, un promoteur et un TAR (trans-activating response element). Dans les lymphocytes T quiescents, les facteurs de transcription inductibles de l'hôte (NFkB, NFAT et AP-1), sont séquestrés dans le cytosol. Leur concentration dans le noyau est donc insuffisante pour initier la transcription au niveau du promoteur. Lorsque les lymphocytes T passent à la forme active, les facteurs de transcription migrent vers le noyau, lient l'extrémité 5' du LTR et promeuvent la transcription virale en recrutant l'ARN Pol II et les coactivateurs de transcription tels que p300 et CBP (Molitor et al., 1990; Gerritsen et al., 1997). Une fois que la protéine virale Tat est exprimée, elle vient se lier à l'extrémité 5' des transcrits d'ARN naissants et favorise leur élongation (Mbonye et al., 2017). L'état de quiescence des lymphocyte T est également associé à une baisse en P-TEFb disponible dans ces cellules (Adams et al. 1994), due à une liaison inhibitrice des protéines HEXIM1 avec ces derniers (Cary et al., 2016; Budhiraja et al., 2013). La protéine P-TEFb est nécessaire à l'élongation; sa baisse entrave à la transcription.

Les modifications de la structure de la chromatine et le remodelage du nucléosome près du 5'LTR influencent la réplication du VIH-1 (Van Lint., 2000). En effet, dans le LTR du provirus, les deux nucléosomes, nuc0 et nuc1, sont localisés de manière définie. Le nuc1, situé au niveau du site d'initiation de la transcription, peut subir certaines modifications telles que la déacétylation des histones par les HDAC (histones déacétylases) et la méthylation des histones et de l'ADN par des méthyltransférases (Van Lint et al., 1996; Williams et al., 2006; Kauder et al., 2009). Ces modifications épigénétiques favorisent la compaction de la chromatine, ce qui empêche les facteurs de transcription d'accéder à l'ADN du promoteur et d'initier la

transcription. En revanche, une décondensation de la chromatine favorise le recrutement des facteurs de transcription donc l'activation de la transcription. À noter que ce mécanisme n'est pas nécessairement impliqué dans l'établissement de la latence, mais plutôt dans le maintien de la latence (Sengupta et Siliciano, 2018; Van Lint, 2013).

Effet cis :

La latence est également modulée par des facteurs propres au VIH. En effet, la transcription dépend de Tat, qui initie une boucle d'autorégulation positive en se liant au TAR. Mais pour un fonctionnement optimal, des quantités seuils de Tat sont requises, autrement, on observe des boucles de rétrocontrôle négatif qui répriment la transcription du VIH (Karn, 2011). Il est intéressant aussi de signaler que le virus contribue à la latence en induisant des mutations de ses propres gènes encodant pour Tat. Ce genre de mutation est particulièrement fréquent dans les cellules en quiescence (Karn, 2011; Sengupta et Siliciano, 2018)

Effet cis/trans

L'interférence transcriptionnelle participe également à l'établissement de la latence virale (Lenasi et al., 2008). Ce mécanisme a lieu lorsque le promoteur du VIH est proche du promoteur d'un gène cellulaire. Si les deux promoteurs sont insérés dans une même orientation, on parle de polarité positive. Dans un modèle cellulaire primaire de latence, le VIH-1 a manifesté une légère préférence pour ce type d'intégration. Dans ce cas, les facteurs de transcription nécessaires à l'activité du promoteur du VIH-1 sont détournés par le promoteur du gène cellulaire. En cas d'orientation opposée, donc de polarité négative, il y aura une diminution de l'activité des deux promoteurs ainsi qu'une production d'ARN et d'ARN antisens suite à "la collision des complexes d'ARN polymérase" (Lenasi et al., 2008; Siliciano et Greene, 2011).

Toutefois, une étude récente réalisée par Yukl et collaborateurs a montré que l'interférence transcriptionnelle ne constitue pas le mécanisme majeur dans le maintien de la latence, et que les processus les plus inhibés dans les cellules latentes sont l'élongation, la polyadénylation et l'épissage multiple des transcrits du VIH (Yukl et al., 2018).

2.2. La quantification du réservoir

L'identification de la meilleure technique de mesure du réservoir du VIH fait toujours débat et fait l'objet de multiples controverses. En effet, un test idéal ne tiendrait compte que de l'ensemble du réservoir compétent à la réplication sans inclure les virus défectueux. Il est important de garder à l'esprit que la majorité des provirus dans les cellules T CD4⁺ quiescentes des individus sous TARc suppressive sont défectueux et ne doivent pas être considérés comme faisant partie du réservoir latent (Ho et al., 2013; Bruner et al., 2016). Cela dit, le progrès dans le développement de techniques sensibles a remis en question l'estimation classique de la taille du réservoir et on postule que le réservoir du VIH-1 pouvait être soixante à soixante-dix fois plus grand qu'on ne le pensait auparavant. Il sera question dans cette partie de faire le tour des principales techniques employées pour la quantification du réservoir.

2.2.1. Essais basés sur la PCR

Les techniques basées sur la réaction en chaîne de polymérase (PCR) sont couramment utilisées pour quantifier le réservoir viral. La PCR peut détecter de très petites quantités d'ADN ou d'ARN, fait important en raison du faible nombre de copies de VIH chez les patients traités au moyen de TARc.

La PCR quantitative (qPCR) est la méthode la plus commune de mesure de l'ADN proviral. Elle mesure l'ADN total, qui comprend les formes intégrées et non intégrées. Généralement, la qPCR est réalisée sur l'ADN extrait à partir de cellules mononuclées du sang périphérique total (PBMC) ou bien de lymphocytes T CD4⁺ enrichis. Mais, de plus en plus, les laboratoires préconisent de travailler directement sur le lysat cellulaire, en se servant de divers détergents ou de la protéinase K, et d'éviter l'étape d'extraction d'ADN, afin d'améliorer l'efficacité de la récupération des acides nucléiques et de réduire la quantité de cellules utilisées (Vandergeeten et al., 2014). Cette PCR utilise des amorces et des sondes fluorescentes spécifiques de régions conservées du génome viral (Pol ou Gag) avec d'autres spécifiques d'un gène cellulaire endogène (Eriksson et al., 2013; Rouzioux et al., 2014). Une courbe standard est construite avec un nombre connu de copies d'ADN proviral en utilisant un gène de référence. Par la suite, le ratio de l'expression du gène cible par rapport au gène de référence sera utilisé pour normaliser les mesures obtenues.

La PCR offre également la possibilité de quantifier les formes intégrées seules grâce à la technique Alu PCR. Ce protocole est basé sur l'utilisation simultanée des amorces se liant aux éléments Alu hautement répétitifs dans le génome humain avec des amorces spécifiques au génome viral ciblant le Gag du VIH (O'Doherty et al., 2002; Vandergeeten et al., 2014). Les formes épisomales non intégrées, tels que les cercles 1-LTR et 2-LTR, peuvent être également détectées par PCR utilisant des amorces spécifiques à la jonction circulaire (Vandergeeten et al., 2014). Ces formes ne font pas partie du réservoir latent, mais elles sont utilisées comme des marqueurs d'une infection récente, bien que certaines études indiquent qu'*in vitro*, les cercles 2-LTR peuvent persister très longtemps (Pace et al., 2013).

Ces techniques présentent l'avantage d'être simples, reproductibles, rapides et réalisables à partir de matériel cellulaire ou tissulaire. Les résultats obtenus sont exprimés en copies/million de PBMC ou de cellules T CD4⁺, ce qui traduit la fréquence d'infection cellulaire. Toutefois, cette fréquence est au moins deux à trois fois plus élevée que celle mesurée par QVOA (voir plus loin). En fait, la qPCR tient compte à la fois des séquences de VIH intactes et défectueuses, ce qui surévaluera la taille du réservoir.

Une autre génération de PCR a été développée offrant une meilleure sensibilité et une haute précision: le droplet digital PCR (ddPCR). Après l'extraction de l'ADN, le système ddPCR sépare l'échantillon en gouttes par émulsification, suivi par une PCR. Ainsi, même les plus faibles quantités de molécules présentes dans chaque goutte seront ciblées et amplifiées. La limite de détection inférieure est de 100 copies par mL et la limite supérieure est de 100 000 copies par mL. L'inconvénient est que cette technique est coûteuse, mais aussi qu'elle tend, comme la PCR, à surestimer la taille du réservoir (Strain et al., 2013).

Technique de PCR ultrasensible, le single copy assay (SCA) a rendu faisable la quantification de faibles taux d'ARN viral plasmatique, permettant de mesurer jusqu'à une copie par ml de plasma. Le SCA se sert d'amorces spécifiques aux régions hautement conservées de l'intégrase et de Gag. La limite de cette technique est qu'elle nécessite un grand volume de plasma (7 mL), du au nombre élevé de réactions à effectuer. Aussi, cette technique tend à surestimer la taille du réservoir compétent à la réplication, car les transcrits viraux ne seront pas tous traduits en protéine (Palmer et al., 2003; Palmer et al., 2008).

2.2.2. Essais basés sur la culture cellulaire

Le quantitative viral outgrowth assay (QVOA) est considéré comme le "standard en or" jusqu'à aujourd'hui (Finzi et al., 1997; Finzi et al., 1999; Crooks., 2015). Le principe est de mesurer la fréquence de lymphocytes T CD4⁺ en quiescence capable de produire du virus infectieux après stimulation. Ce test repose sur l'isolation des lymphocytes T CD4⁺ quiescents à partir du sang périphérique des patients sous TARc. Ces cellules sont considérées quiescentes lorsqu'elles n'expriment pas les marqueurs d'activation classiques telles que CD69, CD25 ou HLA-DR et dans la plupart des cas ne produisent pas de virus sans stimulation. Une fois isolées, ces cellules sont diluées et activées à l'aide de phytohémagglutinine (PHA), un mitogène. Après 1 jour de stimulation, des lymphoblastes CD4⁺ de donneurs sains sont ajoutés pour permettre la réplication et la propagation du VIH. Après 14 jours, les surnageants sont récoltés et analysés par ELISA en utilisant l'antigène p24, ainsi on mesure la fréquence de cellules libérant le virus. Le résultat est exprimé en unités infectieuses par million de lymphocytes T CD4⁺ (IUPM). Les patients sous TARc ont des IUPM comprises entre 0,1 et 1, ce qui correspond à 300 fois moins que les résultats obtenus en mesurant l'ADN proviral du VIH par PCR. Le QVOA présente le grand avantage de détecter uniquement les virus compétents à la réplication. Cependant, il tend largement à sous-estimer la taille du réservoir. En effet, des études effectuées par Ho et al et Cillo et al, ont démontré qu'une seule activation n'était pas suffisante pour réactiver tous les provirus intacts et qu'une importante proportion (11,7%) de provirus non induits ont des génomes inaltérés et sont potentiellement compétents à la réplication. Ces mêmes études suggèrent que la vraie taille du réservoir latent serait plutôt autour de 60 à 70 IUPM. De plus, le QVOA est une technique laborieuse, dispendieuse, nécessitant plusieurs semaines de culture (Ho et al., 2013; Cillo et al., 2014). Aussi le QVOA requiert de larges volumes de sang (120-180 ml) de patients séropositifs et de donneurs sains. De ce fait, ce test est difficilement réalisable dans le cadre d'une étude pédiatrique.

Plusieurs variantes de ce test ont été développées afin de réduire le coût et la durée du QVOA. On retient essentiellement le MOLT4/CCR5 viral outgrowth assay (VOA), qui par l'utilisation des cellules MOLT4/CCR5 pour l'expansion virale à la place des cellules des donneurs, raccourcit la durée nécessaire à la culture à seulement 7 jours (Laird et al., 2013). Ces cellules expriment à la fois les co-récepteurs CXCR4 et CCR5 et donc sont hautement

permissives à la réplication du VIH-1. Le test ELISA utilisé en QVOA est également remplacé ici par une RT-PCR pour quantifier le nombre de copies d'ARN viral dans le surnageant de chaque puits, réduisant ainsi le temps nécessaire pour effectuer le test. De plus, les fréquences de latence mesurées par MOLT4/CCR5 VOA et par QVOA corrélerent (Laird et al., 2013). Cette variante est plus rapide, sensible, plus économique, demande moins de main-d'œuvre et est donc plus adaptée aux essais cliniques à grande échelle. Cependant, comme pour QVOA, la taille du réservoir latent est sous-estimée.

Plus récemment, Gupta et son équipe ont mis au point une nouvelle technique basée sur la culture cellulaire, le TZM-bl cell based assay (TZA) (Sanyal et al., 2017). Ce test utilise la lignée cellulaire TZM-bl qui exprime les marqueurs CD4, CCR5 et CXCR4 et porte une copie du gène encodant la β -galactosidase (β -gal) sous contrôle du promoteur LTR du VIH-1. Lorsque ces cellules sont infectées par le VIH, la protéine Tat produite durant la réplication vient activer la région LTR. Il en résulte alors l'induction de l'expression de la β -gal. Le TZA consiste en deux étapes: l'activation des lymphocytes T CD4⁺, suivie de la quantification du virus compétent à la réplication dans les cellules TZM-bl corrélée à l'expression de β -gal. Cette technique sensible nécessite un petit volume de sang. Elle est donc plus rapide et moins coûteuse que le QVOA, mais surtout elle permet de quantifier une taille du réservoir 70 fois plus grande que celle obtenue en QVOA. Ce test indique qu'il y aurait une cellule capable de se répliquer suite à une stimulation pour 20,000 lymphocytes T CD4⁺ quiescents versus une cellule dans un million de lymphocytes T CD4⁺ obtenu en QVOA. Le niveau du fPVE (fractional HIV-1 provirus expression ou expression partielle du provirus VIH-1) déterminé par TZA peut être utilisé comme une mesure précise de la taille du réservoir compétent pour la réplication (Sanyal et al., 2017). Cette technique a été récemment développée mais pas largement adoptée.

2.2.3. Essais de nouvelle génération

Le tat/rev induced limiting dilution assay (TILDA) estime la fréquence des lymphocytes T CD4⁺ contenant des virus inductibles en mesurant la production d'ARN viral polyépisé Tat-Rev dans ces cellules (Procopio et al., 2015). C'est l'ARN minimal nécessaire pour assurer une transcription efficace du virus après activation. Cette technique est sensible, rapide et ne quantifie pas les virus défectueux. Cependant, il est tout de même concevable qu'un provirus

produisant l'ARN Tat-Rev ne puisse pas produire de particules virales. Il est aussi pensable que certains provirus intacts ne seront pas réactivés après une seule vague de stimulation. TILDA mesure une plus grande proportion du réservoir latent que le QVOA (48 fois plus élevée) tout en étant plus sélective que les approches traditionnelles basées sur la PCR (proportion 6 à 27 fois inférieure à celle obtenue en PCR) (Procopio et al., 2015).

Une nouvelle technique a été mise au point combinant l'ARN FISH (fluorescence in situ hybridization) avec la détection concomitante de protéine virale (p24) en cytométrie en flux après induction par des agents inverseurs de latence. En bref, la cytométrie en flux permet la détection à la fois de marqueurs intracellulaires (la protéine virale p24 Gag) et de marqueurs de surface (par exemple CD4 et CD45RO). Tandis que la FISH permet en premier temps de colorer les cellules en surface pour détecter les marqueurs phénotypiques et de colorer en intracellulaire la protéine Gag. Cela est suivi d'une étape impliquant la transcription inverse de l'ARN Gag-Pol et son amplification. Les lectures sont ensuite obtenues par la cytométrie en flux. Le Flow-FISH est la première technique mise au point permettant à la fois de mesurer l'ARN viral, une protéine virale et les marqueurs de surface cellulaire et semble être très prometteuse dans la recherche d'une méthode idéale pour la mesure du réservoir latent. Cependant c'est une technique coûteuse, nécessitant de multiples manipulations et qui tend à surestimer de la taille du réservoir en quantifiant certains provirus défectueux (Baxter et al., 2017).

iCARED est aussi une technique péremptoire basée sur la mesure de l'ARN viral (Hodel et al., 2016). Les lymphocytes T CD4⁺ sont activés en utilisant des anticorps monoclonaux anti-CD3/anti-CD28, mimiquant la présentation antigénique, en présence d'un inhibiteur d'intégrase (raltegravir) pour bloquer la propagation du virus. Après 3 jours de culture, on effectue une extraction d'ARN, suivie d'une qPCR visant à amplifier les régions de gag ou bien tat/rev. Cette technique permet de mesurer une moyenne de 51 lymphocytes T CD4⁺ infectés par million. C'est une technique sensible, rapide et relativement simple.

La stimulation à la prostratine: La prostratine est un agent inverseur de latence. Elle a été isolée pour la première fois à partir d'une plante (*Pimelea prostrata*). Depuis, des analogues furent synthétisés, avec des EC50 jusqu'à 1000 fois plus faibles. En effet c'est un activateur de la protéine kinase C (Kazanietz et al., 1993), mais, contrairement au PMA, qui a une structure apparentée, la prostratine n'est pas promotrice de tumeur ou irritante. Au contraire, il a été

prouvé qu'elle régule à la baisse les récepteurs de type CXCR4 et même CCR5, protégeant ainsi les lymphocytes T CD4⁺ et qu'elle régule à la hausse l'expression du marqueur d'activation cellulaire CD69 (Hezareh et al., 2004; Korin et al., 2002). Par ce fait, elle semble une bonne candidate pour la thérapie « shock and kill » qui est en bref une stratégie thérapeutique visant à activer les cellules latentes infectés afin qu'elles soient éliminées par effet cytopathique et par le système immunitaire (Deeks, 2012). La mise au point d'une nouvelle technique mesurant le réservoir inductible est basée sur la capacité de la prostratine à activer la PCK, donc à activer la voie de signalisation NF-κB. Le facteur de transcription NF-κB migre vers le noyau et lie le domaine LTR du virus, donc active la transcription virale. Ensuite, les surnageants de la culture sont récupérés et on mesure par PCR la quantité d'ARN viral qui a été induit (Beans et al., 2013).

Tableau 1: Techniques de mesure du réservoir du VIH-1

Technique	Nombre de cellules requis	Unité de mesure	Notes
Le quantitative viral outgrowth assay (QVOA)	Variable - $\geq 30 \cdot 10^6$ lymphocytes T CD4 ⁺	Unités infectieuses par million de lymphocytes T CD4 ⁺ (IUPM)	Le "standard en or" mesurant la fréquence de virus compétents à la réplication. Quantifie la protéine p24 virale. Technique laborieuse, chère et nécessite très grand nombre de cellules.
TZM-bl based outgrowth assay (TZA)	$\geq 2 \cdot 10^6$ lymphocytes T CD4 ⁺ quiescents	Unités infectieuses par million de lymphocytes T CD4 ⁺ (IUPM)	Économique et consomme moins de cellules que QVOA. Taille estimée du réservoir 70 plus grand que QVOA. Technique récemment développée et peu utilisée.
PCR Quantitative (qPCR) mesurant ADN HIV-1 total	$\geq 1 \times 10^6$ lymphocytes T CD4 ⁺ , PBM ou cellules des tissus	Copies ADN HIV-1/million cellules	ADN proviral total. Peut être adaptée pour mesurer 2-LTR cercles. Rapide, nécessite peu de cellules. Surestime grandement la taille de réservoir comme la plupart des séquences d'ADN sont défectueuses
TILDA	$\geq 1 \cdot 10^6$ lymphocytes T CD4 ⁺	Nombre de cellules exprimant msARN/million lymphocytes T CD4 ⁺	Quantifie les virus compétents à la réplication tenant compte d'ARN viral transcrit dans les lymphocytes T CD4 ⁺ activés. Ne corrèle pas avec la QVOA.
VIH-1 RNA FISH+ p24 Cytométrie en flow	$\geq 5 \cdot 10^6$ lymphocytes T CD4 ⁺	HIV-1 RNA+/Gag+ événements /million lymphocytes T CD4 ⁺	Combine l'ARN FISH avec la détection simultanée de protéine virale p24 en cytométrie en flux. Extrêmement sensible à température d'hybridation et nécessite beaucoup de manipulation.
Single Copy Assay (SCA)	7 mL de plasma	Copies du virus /mL de plasma	Un test ultrasensible qui détecte l'ARN viral plasmatique dans les échantillons des patients sous TARc suppressive. Les transcrits viraux ne sont pas tous traduits en protéine, donc peut surestimer la taille du réservoir compétent la réplication
Stimulation à la prostratine	$\geq 1 \cdot 10^6$ lymphocytes T CD4 ⁺	Log ₁₀ copies d'ARN viral/ 10 ⁶ lymphocytes T CD4 ⁺	Décrit le réservoir inductible. Plus rapide et moins coûteuse que la QVOA, toutefois, très peu utilisée.

3. Impact de l'initiation précoce du traitement sur les réservoirs du VIH-1

3.1. Cinétique de la décroissance virale

Le réservoir s'établit très tôt au moment de la primo-infection. Des études menées chez le macaque infecté par le virus de l'immunodéficience simienne (SIV) indiquent une expansion très rapide du réservoir viral dans les 3 jours suivant l'infection (Whitney et al., 2014). Plus récemment, une étude était effectuée chez huit individus infectés ayant commencé la TARc durant le stade le plus précoce de la phase aigüe de l'infection (Fiebig I) et ayant poursuivi le traitement pour une moyenne de 2.8 ans. Tous ces participants ont connu un rebond rapide de la charge virale après l'interruption de la TARc (Colby et al., 2018). Il est pertinent de garder à l'esprit que le réservoir s'établit très tôt lors de la primo-infection, et que tous les ART utilisés jusqu'à date n'arrivent pas à atteindre le réservoir une fois constitué. Nonobstant, les TARc va avoir un impact et pourrait perturber la poursuite de l'établissement du réservoir.

Après l'initiation de TARc, la charge virale plasmatique diminue comme les antirétroviraux suppriment la réplication virale et préviennent l'infection de nouvelles cellules cibles. Le virus libre dans le plasma a une demi-vie courte d'environ 6 heures (Perelson et al., 1996). Par conséquent, la charge virale plasmatique est fortement corrélée à la demi-vie des cellules infectées relâchant le VIH dans le sang (Palmer et al., 2011).

La modélisation mathématique a décrit 4 phases de décroissance virale proportionnelles à la demi-vie des différentes cellules infectées, dont principalement les lymphocytes T CD4⁺ (Figure 7) (Palmer et al., 2011). La première phase dure de 1 à 2 jours, lors de laquelle on observe une diminution exponentielle et rapide de la charge virale plasmatique. La plupart des virus plasmatiques dans le cas d'infection par le VIH non traitée sont produits par les lymphocytes T CD4⁺ activés, dont la demi-vie est de 1 à 2 jours. Cette première phase est attribuée à l'élimination du virus et à la lyse des lymphocytes T CD4⁺ par effet cytopathique viral et par les défenses immunitaire de l'hôte (Perelson,et al., 1996; Palmer et al., 2008). La deuxième phase est plus lente, durant laquelle le déclin de la virémie est dû à l'élimination d'autres populations cellulaires infectées dont la demi-vie est plus longue (de 14 à 21 jours), à

savoir: les lymphocytes T CD4⁺ partiellement activés, les macrophages et les cellules dendritiques. Par ailleurs, c'est durant cette phase que les patients vont présenter une charge virale contrôlée, c-à-d. une charge virale en dessous de la limite de détection des tests utilisés en pratique clinique (<50 copies/ml) (Blankson et al., 2002, Palmer et al., 2008). Le déclin de la virémie résiduelle est aussi biphasique et comporte une première phase où on observe une faible diminution de la virémie résiduelle correspondant à l'élimination des lymphocytes T CD4⁺ infectés de manière latente, qui ont une demi-vie de 6-44 mois, suivi d'une dernière phase où il y a peu ou pas de baisse de la charge virale (stable autour de 1 à 5 copies/ml), suggérant la présence d'un petit nombre de cellules infectées présentant un degré élevé de stabilité, incluant les lymphocytes T CD4⁺ mémoires et naïfs (Besson et al., 2014; Riddler et al., 2015).

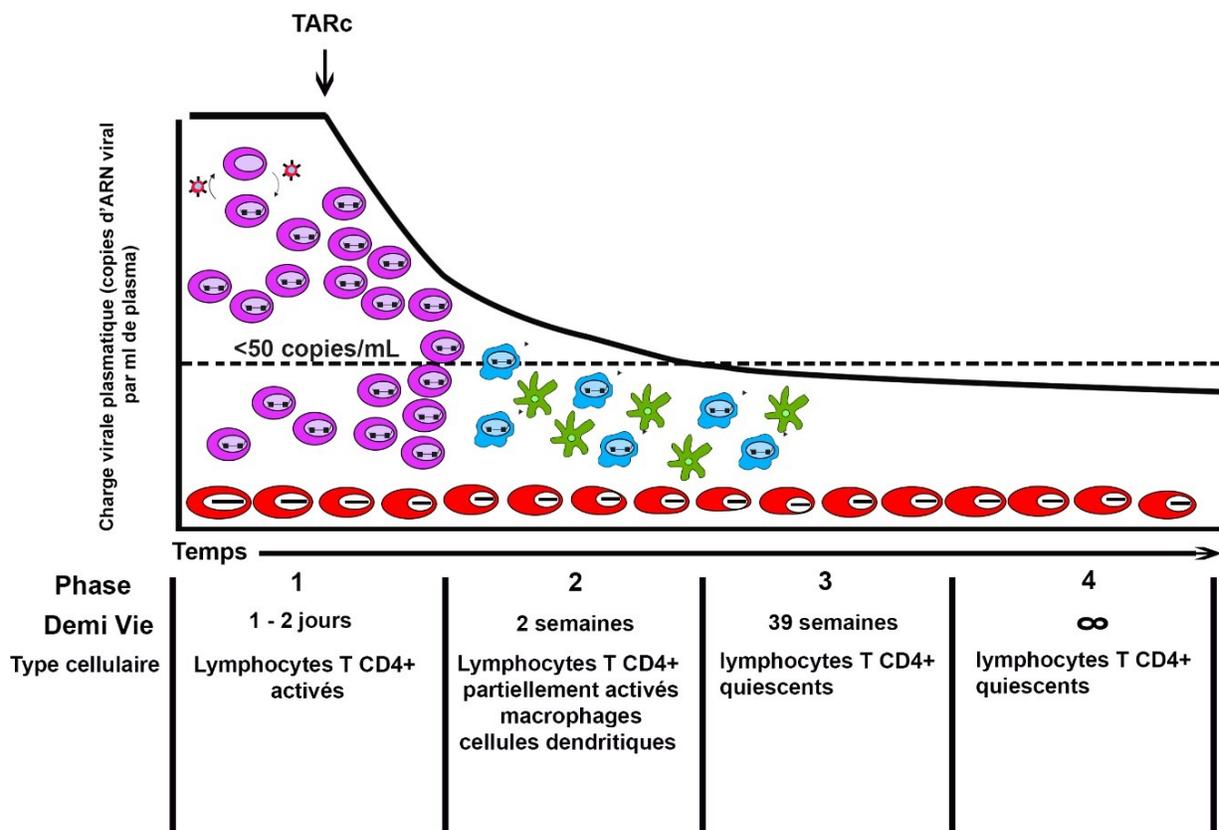


Figure 7 : Les quatre phases de la décroissance de la production virale après initiation de la TARc et les populations cellulaires responsables de la production des virions à chaque phase.

Les cellules en violet représentent les lymphocytes T CD4⁺ activés, en bleu les lymphocytes T CD4⁺ partiellement activés, en vert autres types cellulaires, en rouge les cellules quiescentes à longue demi-vie principalement les T CD4⁺ mémoires (adapté de Palmer et al., 2011)

3.2. Impact du traitement précoce sur la taille et la stabilité des réservoirs de VIH-1 mesurés dans les PBMC

La taille du réservoir mesurée dans les cellules du sang périphérique a une valeur pronostique quant à l'évolution immunologique et clinique de la maladie. En effet, elle est d'autant plus élevée que le niveau d'ARN viral est élevé, que les patients sont symptomatiques et que le niveau de lymphocyte T CD4⁺ est bas. En plus, elle reflète le niveau du réservoir total sachant qu'elle corrèle avec la taille des réservoirs mesurés en primo-infection dans les compartiments muqueux digestifs (Li et al., 2016).

Li et al ont démontré que le niveau du réservoir est prédictif du moment du rebond viral après l'interruption du traitement. En effet, chez les participants traités précocement par TARc durant la phase aigüe de la maladie le taux d'ARN était d'une médiane <92 contre 156 copies d'ARN du VIH-1/ 10⁶ lymphocyte T CD4⁺ chez les sujets traités en phase chronique. Par ailleurs, des niveaux plus élevés d'ARN-viral étaient associés de manière significative à un délai plus court du rebond viral après suspension du traitement (≤ 4 semaines contre 5–8 semaines contre > 8 semaines pour des médianes de 182 vs 107 vs <92 copies d'ARN du VIH-1/10⁶ Lymphocytes T CD4⁺). Une plus petite taille du réservoir est donc associée à une rémission prolongée de la virémie plasmatique après interruption (Li et al., 2016).

Un cas qui a suscité l'attention de la communauté scientifique est celui du « Bébé du Mississippi ». Il s'agit d'un bébé né par voie vaginale, issu d'une mère virémique infectée par le VIH qui ne suivait pas de traitement antirétroviral. La charge virale du bébé à la naissance était de 4.3 log₁₀ copies/ml de plasma, suggérant que la transmission avait eu lieu à la fin de la grossesse. Le nourrisson a bénéficié d'une TARc très précoce et intense à 30 heures de vie qui a été poursuivie pendant 18 mois puis interrompue. Cela a permis un contrôle relativement rapide (28 jours d'âge) et soutenu de la réplication virale jusqu'à l'âge de 30 mois malgré l'interruption de la TARc, mais aussi une énorme diminution de la taille du réservoir viral

lymphocytaire sanguin. Les tests ultrasensibles pour la quantification de l'ADN viral étaient intermittents, alors que la quantification des virus compétents pour la réplication par QVOA était négative pendant cette période de rémission virologique. Malheureusement, à environ 46 mois de vie, la virémie plasmatique était décelable chez le bébé et on lui a prescrit la TARc pour contrôler la virémie. Il est important de noter que le rebond viral a généralement lieu dans les 4 premières semaines suivant la suspension de la TARc, donc plus de 2 ans de contrôle immunovirologique maintenu après l'arrêt de la TARc, comme dans le cas du Bébé du Mississippi, est exceptionnel. Dans l'ensemble, malgré le fait que le Bébé du Mississippi ne soit pas guéri comme espéré, cette étude a suggéré qu'un traitement précoce pouvait inhiber l'établissement des réservoirs de VIH-1 et que des plus petits réservoirs pourraient mener à des rémissions virales prolongées (Persaud et al., 2013; Luzuriaga et al., 2015).

Intrigué par l'évolution de l'infection chez le Bébé du Mississippi, notre équipe a fait partie d'une collaboration canadienne qui a rapporté en 2014 l'histoire de 4 cas de patients pédiatriques canadiens avec suppression virale soutenue (SVS) qui étaient similaires à l'enfant rapporté par Persaud et al. Ces patients avaient été infectés ante partum et ont reçu une TARc dans les premières 72 heures de vie. La SVS a été établie à l'âge de 6 mois et maintenue (jusqu'à date). La taille du réservoir viral était infinitésimale et aucun d'entre eux ne présentait de réponses à médiation cellulaire T spécifique à Gag ou Nef du VIH détectable en ELISpot, suggérant que la suppression virale était atteinte avant le développement de la réponse immunitaire spécifique au VIH. À noter que chez ces patients, on n'a pas interrompu la TARc (Bitnun et al., 2014).

Chez les adultes traités en phase chronique, la demi vie des lymphocytes T CD4⁺ quiescents ayant intégré l'ADN proviral dans leur génome est de 44 mois. Hocqueloux et al ont recruté 307 patients, dont 35 ont commencé une TARc au cours de la primo-infection (moins de 4 mois après l'infection) et 272 au cours de la phase chronique (Figure 8). La régression du niveau de l'ADN viral a été mesurée grâce à un modèle exponentiel à effets mixtes non linéaires, ce qui a montré que la cinétique de la décroissance de l'ADN viral était biphasique et que la régression des deux phases était significativement plus prononcée dans le groupe traité en primo-infection. Après une moyenne de 4 ans de suppression virale, la taille du réservoir mesuré en ADN proviral était nettement plus basse dans le groupe traité en primo-infection, avec une

médiane de 2.15 contre 2.84 \log_{10} copies/ 10^6 PBMC. Chez ces patients, cette réduction de la taille du réservoir était accompagnée d'une restauration immunitaire plus rapide et prolongée avec une médiane de 883 contre 619 cellules CD4/ mm^3 , et un meilleur ratio CD4/CD8 (Hocqueloux et al., 2013). Sans oublier l'étude « VISCONTI » (Viro-Immunological Sustained Control after Treatment Interruption) qui portait sur 14 patients adultes dont le traitement avait été initié entre 1.1 et 2.1 mois après l'infection et a duré 37 mois, ce qui a permis le maintien de la SVS pour une moyenne de 89 mois après l'arrêt du traitement. Mais en plus, chez ces participants, les niveaux des réservoirs étaient comparativement bas et les réponses spécifiques T CD8⁺ étaient diminuées avec un niveau d'expression de marqueurs d'activation CD8 aussi faible (Sáez-Ciri3n et al., 2013).

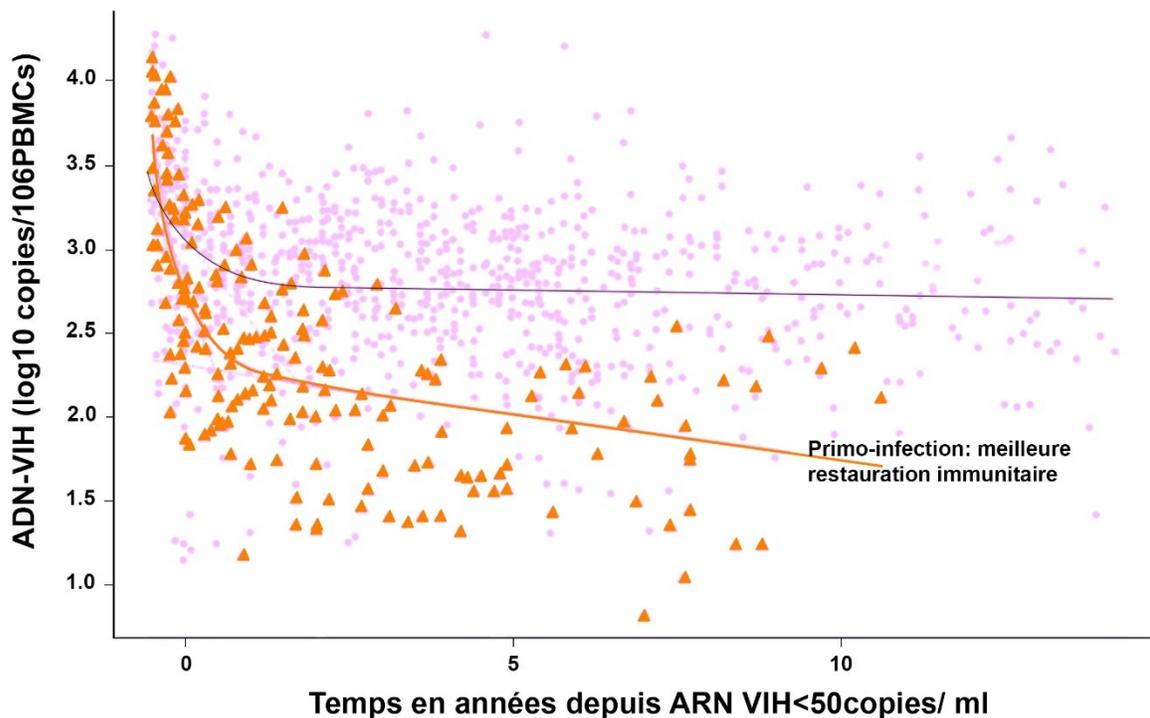


Figure 8 : Modélisation de la régression du niveau de l'ADN viral, en fonction du moment de l'initiation du traitement. En violet, les patients traités en phase chronique (n= 235), et en orange les patients traités en primo-infection (n= 35) (adapté de Hocqueloux et al., 2013).

La régression du réservoir latent du VIH est plus rapide chez les individus qui commencent un traitement antirétroviral précoce après l'infection. En effet, une taille limitée du

réservoir initial de cellules T CD4⁺ infectées de manière latente a été proposée comme étant le facteur le plus important contribuant à une plus petite taille du réservoir après plusieurs années de traitement (Buzon et al., 2014; Chun et al., 2007). Archin et al. ont démontré que, bien que la fréquence des cellules infectées quiescentes diminue après la première année du traitement antirétroviral chez les patients infectés, aucune décroissance supplémentaire n'est constatée une fois que cette fréquence atteint des niveaux très bas (moins de 0,5 cellule par million). Par conséquent, une sous population de cellules infectées de manière latente peut persister indéfiniment, même chez les patients qui ont commencé un traitement antirétroviral pendant la primo-infection. L'identification du phénotype de ces cellules, dans lequel le VIH peut persister perpétuellement, fait l'objet de recherches approfondies (Archin et al., 2012). En effet, la composition du réservoir, c-à-d sa répartition dans les sous-populations des cellules T CD4⁺, peut fournir des informations cruciales sur les mécanismes de persistance du VIH. Plusieurs études récentes indiquent que la TARc précoce influence grandement ce paramètre (Chomont et al., 2009; Chéret et al., 2015).

3.3. Effet du traitement précoce sur la distribution du réservoir dans les différentes sous-populations lymphocytaires

L'étude de Ganesan et al. a évalué la distribution des sous-populations lymphocytaires chez des patients non traités en phase tardive de primo-infection. Ces derniers ont rapporté que les TN étaient la sous-population majoritaire, bien que son niveau fût plus bas que celui observé chez des sujets sains, et que le pourcentage des cellules mémoires à demi-vie courte, les TEM et les TTM, était fortement altéré (Ganesan et al., 2010). En effet, les TEM et TTM expriment fortement le récepteur CCR5 donc sont vite détruites (Li et al., 2005; Mattapallil et al., 2005). Cette perte est ensuite compensée par une prolifération des autres sous populations de lymphocytes mémoires à longue demi-vie (Picker et al., 2006). En conclusion à cette étude, les sous populations lymphocytaires mémoires présentent le niveau d'infection le plus élevé et une contribution majeure au réservoir (Ganesan et al., 2010). Semblablement, chez les patients chroniques non traités, le stock des TN était encore plus diminué dû à la fibrose progressive des tissus lymphoïdes et les TCM avaient le niveau d'infection le plus élevé comparé aux autres sous populations mémoire qui contribuent aussi majoritairement au réservoir.

Chomont et al. ont montré que chez 17 patients adultes en SVS traités en phase chronique, la contribution des sous-populations de lymphocytes T CD4⁺ mémoire (TCM, TTM et TEM) au pool de cellules infectées étaient similaires, mais que la contribution des TCM était la plus importante. Dû à leur longue vie et leur capacité replicative, les TCM jouent un rôle clé dans le maintien du réservoir (Chomont et al., 2009). Cependant, l'étude OPTIPRIM, réalisée sur 10 patients traités très précocement en primo infection et après 2 ans de traitement, a démontré la contribution majeure des TTM au réservoir. En revanche, les TCM et les TN étaient déjà infectées mais contribuaient d'une façon beaucoup moindre au maintien du réservoir (Chéret et al., 2015). Donc, le réservoir chez les patients traités en phase chronique est un réservoir à demi-vie longue (TCM) à comparer avec un réservoir à demi-vie courte (TTM) chez les patients traités en primo infection (Figure 9).

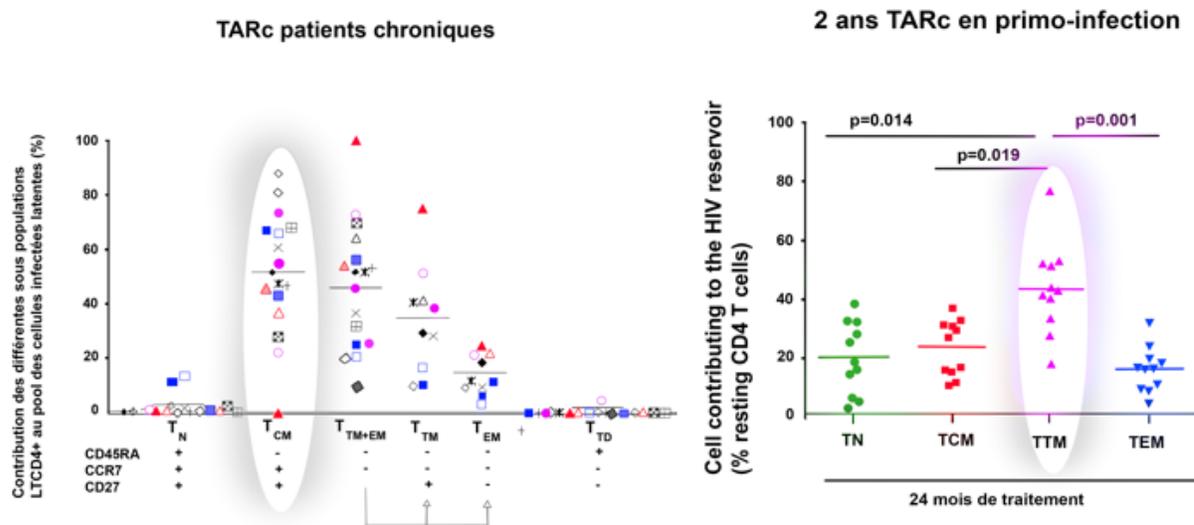


Figure 9 : La distribution du réservoir dans les différentes sous-populations lymphocytaires CD4⁺ chez des participants traités en phase chronique versus des participants traités en primo-infection. À gauche, la distribution du réservoir dans les différentes sous-populations Lymphocytaires CD4 chez 17 participants traités en phase chronique de l'infection par le VIH (TTD: lymphocyte T terminal différencié) (adapté de Chomont et al., 2009). À droite, la distribution du réservoir dans les différentes sous-populations lymphocytaires CD4⁺ chez 10 participants traités en primo-infection (adapté de Chéret et al., 2015).

Plusieurs études ont tenté de définir les contributions relatives de chacune de ces sous populations au réservoir en comparant l'ADN proviral total qu'elles contiennent. En général, ces études ont montré que les cellules TCM, TTM et TEM contenaient systématiquement des taux plus élevés d'ADN du VIH-1 que les cellules TN. Par conséquent, les études sur les réservoirs se sont principalement concentrées sur le compartiment des cellules T CD4⁺ mémoires, et la population TN a été largement négligée.

Tout récemment, une étude réalisée par Zerbato et al. chez 7 adultes en SVS depuis plus de 5 ans et traités en phase chronique a montré que bien que la fréquence d'infection à VIH-1 soit plus faible dans les TN que dans les TCM, le virus est produit de la même façon, voire même plus à partir de la population TN. En effet, le niveau d'ADN proviral total était plus élevé dans les TCM comparé aux TN (une médiane de 2,179 copies/10⁶ cellules contre 684 copies/10⁶ cellules). Cependant, suite à l'activation des cellules avec 6 différents LRAs, les quantités d'ARN viral produites n'étaient pas significativement différentes des sous populations TN et TCM. Fait intéressant, pour 4 des 7 donneurs, les niveaux d'ARN des virions produits étaient plus élevés dans les cellules TN que dans les cellules TCM. Cette même étude a mis en évidence que la fréquence de virus infectieux compétents à la réplication était similaire dans les deux sous populations (Zerbato et al., 2019).

Le réservoir du VIH a été considérablement étudié chez les adultes, cela dit, peut d'études ont été menés chez la population infantile. Une étude très récente menée chez les enfants macaques infectés par le SIV en SVS indique la contribution majeure de la sous-population de lymphocytes T CD4⁺ naïfs au pool de cellules infectées quiescentes, avec un pourcentage de 74% comparé aux 14% retrouvé chez le macaque adulte, suggérant l'importance critique de cette sous population dans la persistance du VIH chez l'enfant (Mavigner et al., 2018). Cette constatation nous incite à vouloir examiner les mécanismes de l'établissement et du maintien de la latente dans cette sous population, et à étudier l'impact de l'initiation précoce de la TARc. Ce qui pourrait nous mener à proposer de nouvelles stratégies thérapeutiques pour le VIH pédiatrique.

4. Rationnel et hypothèse de l'étude EPIC4 (Early Pediatric Initiation, Canada Child Cure Cohort Study).

Le réservoir du VIH s'établit très tôt au moment de la primo-infection. Un grand nombre de lymphocyte T CD4⁺ sont rapidement altérés. Toutefois, une petite proportion rentre dans un état de quiescence après avoir intégré le génome viral. Conjointement, on observe un dérèglement majeur de l'homéostasie lymphocytaire et une activation immunitaire accrue. La primo-infection est un moment critique, durant lequel intervenir pourrait altérer la constitution et l'organisation de certains réservoirs, tout en protégeant les capacités des réponses immunitaires spécifiques et non spécifiques (Figure 10). D'une manière générale, l'initiation précoce de la TARc est plus facile dans le cadre de l'infection pédiatrique du fait que l'identification très précoce de l'infection chez l'adulte peut être problématique, tandis qu'une infection pédiatrique acquise par transmission verticale peut être diagnostiquée dans les heures suivant la naissance et l'initiation du traitement peut se faire très rapidement. Par ailleurs, la dynamique de la persistance du VIH chez les enfants est différente de celle observée chez les adultes. En effet, les cellules cibles du VIH sont différentes en type et en nombre chez l'enfant, la tolérance immunitaire est relativement plus élevée et l'activation immunitaire est plus faible, le compartiment LT mémoire est plus réduit et la pharmacocinétique des TAR est distincte dans le sang et les tissus (Goulder et al., 2016; Newell et al., 2004; Richardson et al., 2003). Le réservoir du VIH a été largement étudié chez les adultes infectés par le VIH car il représente un des principaux obstacles à la guérison. Cependant, on en sait moins sur la taille et sur la distribution cellulaire et anatomique du réservoir du VIH, et sur l'impact de l'initiation précoce du TARc sur ces dernières dans la population infantile.

Considérant l'ensemble de ces connaissances, l'étude EPIC⁴ a été élaborée. Cette étude prospective multicentrique avait 2 objectifs principaux. Le premier était de mesurer l'impact d'un traitement puissant initié précocement après la naissance chez l'enfant infecté par transmission verticale sur la taille du réservoir de cellules CD4⁺ infectées et sur sa distribution. Le deuxième était d'étudier l'effet de l'initiation précoce de la TARc sur le développement de la réponse immunitaire (Figure 10). L'étude EPIC⁴ a recruté 221 patients à travers neuf centres pédiatriques canadiens, tous infectés par voie verticale. Il est important de rappeler que la

distribution cellulaire et anatomique du réservoir de VIH chez les enfants est mal élucidée compte tenu des difficultés d'étude des jeunes enfants, car la faible quantité des échantillons est un facteur limitant pour ce genre d'expériences. Toutefois, l'étude EPIC⁴ nous a permis d'obtenir des quantités optimales de sang et de fractions lymphocytaires, ce qui nous permettra d'étudier le réservoir quantitativement et qualitativement. Mon projet de maîtrise s'inscrit dans le cadre du premier volet de l'étude EPIC⁴ et va se restreindre sur l'aspect quantitatif du réservoir.

Hypothèses: La taille du réservoir chez l'enfant infecté par le VIH serait comparable à celle retrouvée chez l'adulte. Cependant, l'initiation précoce de la TARc permettrait de réduire le réservoir à un bas niveau, menant à un meilleur contrôle de la réplication virale suite à une éventuelle interruption de traitement.

Notre objectif principal sera de quantifier et d'évaluer l'impact des traitements précoces sur les réservoirs lymphocytaires sanguins chez les enfants et les adolescents infectés verticalement de l'étude pancanadienne EPIC⁴, mais aussi de comprendre les facteurs clés associés à différents niveaux de réservoirs.

Par ailleurs, nous avons utilisé une nouvelle technique visant à mesurer les niveaux du réservoir inductible après stimulation avec un analogue de la prostratine. Il sera question aussi de développer et de valider cette technique de mesure et d'établir les corrélations entre les résultats générés par cette dernière versus ceux obtenus en PCR mesurant l'ADN total du VIH-1.

Un traitement puissant initié précocement après la naissance chez l'enfant

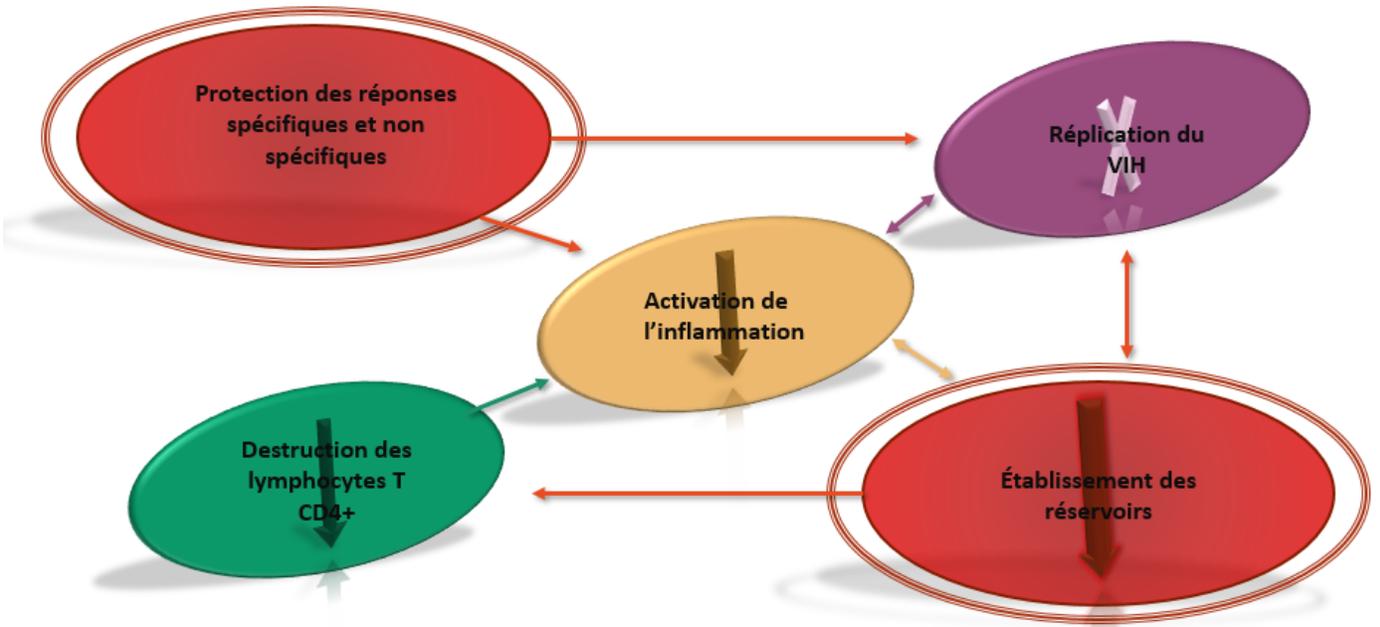


Figure 10 : Rationnelle de l'étude EPIC⁴. Notre étude est basée sur l'hypothèse qu'un traitement puissant initié précocement après la naissance peut protéger les réponses immunitaires spécifiques et non spécifiques et limiter l'amplification du réservoir en diminuant la taille du pool lymphocytaire infecté latent. Le système immunitaire est donc protégé des effets délétères de l'hyperactivation immune généralisée.

DEUXIÈME CHAPITRE : MATÉRIEL ET MÉTHODES

1. Cohorte EPIC⁴

L'étude EPIC⁴ a recruté 221 patients à travers neuf centres pédiatriques canadiens: Hospital for Sick Children à Toronto (n=76), CHU Sainte-Justine à Montréal (n=41), Children's Hospital of Eastern Ontario à Ottawa (n=27), Stollery Children's Hospital à Edmonton (n=21), Children's & Women's Health Centre of British Columbia à Vancouver (n=29), Children's Hospital of Winnipeg à Winnipeg (n=1), McMaster Children's Hospital à Hamilton (n=5), Montréal Children's Hospital à Montréal (n=9) et Royal University Hospital à Saskatoon (n=12). Les patients ont été infectés par la voie verticale. L'étude a été approuvée par les comités d'éthique de la recherche de toutes les institutions participantes. Chaque participant ou son tuteur légal, selon le cas, a fourni un consentement volontaire et éclairé.

Les enfants et les jeunes adultes infectés par le VIH ont été considérés comme infectés de manière périnatale selon les critères suivants: 1. La mère de la personne est séropositive et il n'existe aucune preuve convaincante d'un autre mode d'infection. 2. Le statut de la mère de cette personne n'est pas connu, soit elle est décédée, soit elle n'est pas disponible pour un test de dépistage et il n'existe aucune preuve convaincante d'un autre mode d'infection. D'un point de vue pratique, la probabilité que des enfants soient classés à tort comme infectés de manière périnatale est très faible tenant compte aussi du fait que la transmission périnatale représente plus de 90% des infections à VIH chez les enfants dans le monde (Newell, 2001).

2. Isolation et conservation des cellules mononucléées du sang périphérique

Le sang des participants a été prélevé dans des tubes K₂EDTA (Vacutainer®, Becton & Dickinson, Mississauga, ON). L'isolation des PBMC a été effectuée grâce à une centrifugation par gradient de Ficoll dans des tubes Leucosep™ (Greiner Bio-One, Allemagne). Par la suite, nous avons procédé à un lavage des PBMC dans du milieu RPMI (Wisent, St-Jean-Baptiste, QC) additionné de 5% de sérum de veau foetal (SVF; Wisent, St-Jean-Baptiste, QC). Les PBMC récoltées ont été conservées dans du milieu de congélation appropriée contenant 90% de SVF

et 10% de diméthylsulfoxyde (DMSO; Sigma Aldrich, MO, États-Unis). Les cellules ont été congelées à -80C ensuite transférées dans l'azote en phase liquide jusqu'à leur décongélation.

3. Quantification de l'ADN proviral dans les PBMC

3.1. Préparation des culots cellulaires

Après avoir été décongelées, les PBMC ont été comptées et suspendues à raison de 10^6 PBMC par tube. Ensuite, ces échantillons ont été centrifugés et tout le surnageant a été retiré et les culots cellulaires ont été congelés. Les échantillons ont été envoyés sur glace sèche au Laboratoire du Docteur Nicolas Chomont au Centre de recherche du Centre hospitalier de l'Université de Montréal pour la quantification de l'ADN proviral.

3.2. Quantification de l'ADN proviral (Figure 11)

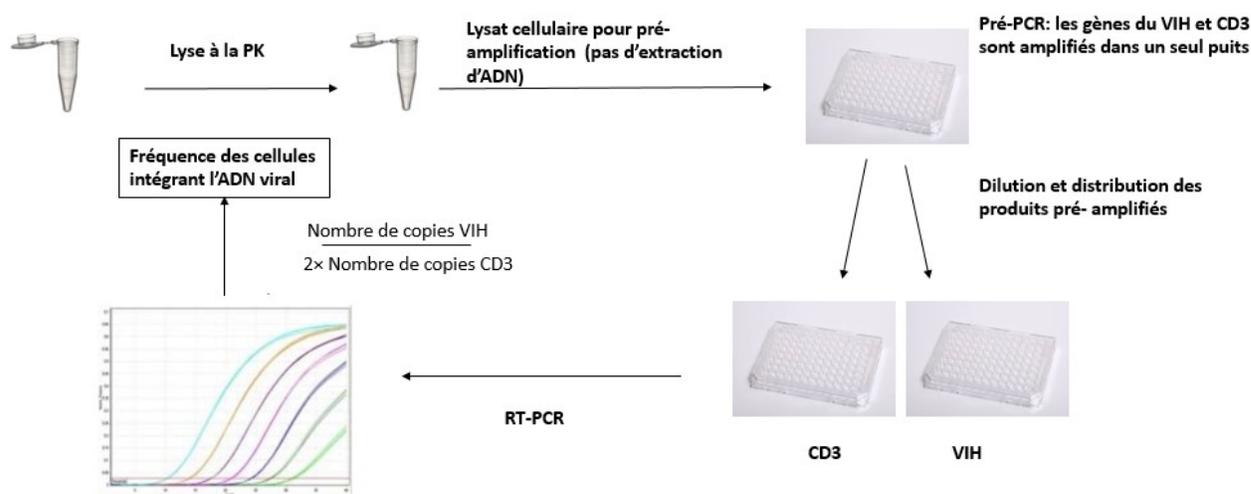


Figure 11 : Principe de la technique basée sur la PCR utilisée pour mesurer l'ADN total du VIH. Les cellules sont digérées avec la protéinase K (PK) et les lysats cellulaires sont utilisés dans une première étape de pré-PCR durant laquelle les gènes du VIH et CD3 sont pré-amplifiés. Ces produits sont dilués et utilisés dans une seconde réaction d'amplification (VIH et CD3): chaque forme est quantifiée par PCR en temps réel. La fréquence des cellules hébergeant de l'ADN proviral est calculée par le ratio: nombre de copies de VIH / 2 x [nombre de copie CD3]. (adapté de Vandergeeten et al., 2014)

Le culot de 10^6 PBMC a été digéré avec (10 mg/ml) de protéinase K (Life Technologies, CA, États-Unis) dans le tampon approprié (Tris HCl 10 mM, 0.1% Tween 20, 0.1% NP40). Ensuite, il a été incubé durant 18 heures à 55°C. Par la suite, la protéinase K a été inactivée par la chaleur à 95°C pendant 10 minutes. Ces lysats ont été utilisés pour l'amplification de l'ADN. Afin de déterminer la fréquence des cellules hébergeant de l'ADN proviral, les niveaux d'ADN total du VIH-1 ont été mesurés par une PCR modifiée qui quantifie à la fois le nombre total de copies d'ADN du VIH et du gène CD3. Une dilution en série de cellules ACH2, portant une seule copie du génome du VIH intégré (Folks., 1989; Clouse et al., 1989), a été utilisée comme courbe standard pour la quantification des gènes du VIH et du CD3, allant de 3 à 3×10^5 cellules (Chomont et al., 2009).

Pour le premier cycle de PCR, l'ADN viral total a été amplifié avec une amorce spécifique de la jonction U3-R LTR contenant une séquence spécifique du phage lambda (ULF1: 5'- ATG CCA CGT AAG CGA AAC TCT GGG TCT CTC TDG TTA GAC-3') et une amorce gag (UR1: 5'- CCA TCT CTC TCC TTC TAG C -3'), ensemble avec des amorces spécifiques du gène CD3 (CD3OUTF: 5-ACT GAC ATG GAA CAG GGG AAG-3; CD3OUTR: 5-CCA GCT CTG AAG TAG GGA ACA TAT-3) (figure 12). En effet, 15 μ l de lysat cellulaire ont été amplifiés dans une réaction de 50 μ l, contenant 0,3 μ M d'amorces ULF1, UR1 et CD3; 0.3 mM dNTPS; 3 mM MgCl₂ et 2.5 U Taq Polymérase (Life Technologies, CA, États-Unis) (Figure 12). Les conditions de PCR pour le premier cycle étaient de 95 ° C pendant 8 minutes suivi de 95°C pendant 1 minute, de 55°C pendant 40 s et de 72°C pendant une minute pour 12 cycles ensuite 75 ° C pendant 15 minutes.

Le produit du premier tour de PCR a été diluée au 1:10 dans de l'eau et a été utilisé pour une seconde amplification. Le nombre de copies de VIH et CD3 a été déterminé dans des puits séparés. La quantification du nombre de copie de VIH a été obtenue à l'aide d'une amorce spécifique à Lambda T (LambdaT: 5'-ATG CCA CGT AAG CGA AAC T -3') et d'une amorce spécifique de la région LTR U5 (UR2: 5'- CTG AGG GAT CTC TAG TTA CC-3'), utilisées en même temps qu'une sonde d'hydrolyse qui s'apparie à la région LTR R (UHIV FamZen: 5'-/56-FAM/CA CTC AAG G/ZEN/C AAG CTT TAT TGA GGC /3IABkFQ/-3') (Figure 12). Le nombre de copies de CD3 a été déterminé en utilisant des amorces spécifiques pour le gène CD3 (HCD3 in 5': 5'-GGC TAT CAT TCT TCT TCA AGG T-3' et HCD3 in 3': 5'-CCT CTC TTC

AGC CAT TTA AGT A-3') avec une sonde CD3 (CD3 FamZen: 5'-/56-FAM/AG CAG AGA A/ZEN/C AGT TAA GAG CCT CCA T/3IABkFQ/-3').

Par la suite, 6.4 μ l du produit dilué ont été transférés dans un mélange final de 20 μ l, pour la réaction de second tour, contenant 1.25 mM d'amorce, 0.2 mM de sondes, 0.2 mM de dNTP et Perfecta ToughMix (QuantaBio, MA, États-Unis). Les conditions de PCR pour le deuxième tour étaient une étape de dénaturation de 95°C pendant 4 minutes, suivi de 40 cycles 95°C pendant 3 s et 60°C pendant 10 s. La PCR a été réalisée avec RotorGene (Qiagen, CA, États-Unis). Le ratio des copies de VIH et des copies de CD3 (2 copies de CD3 / cellule) présente la fréquence des cellules hébergeant de l'ADN proviral. Les résultats sont exprimés en copies de l'ADN du VIH /10⁶ PBMC (Chomont et al., 2009; Vandergeeten et al., 2014).

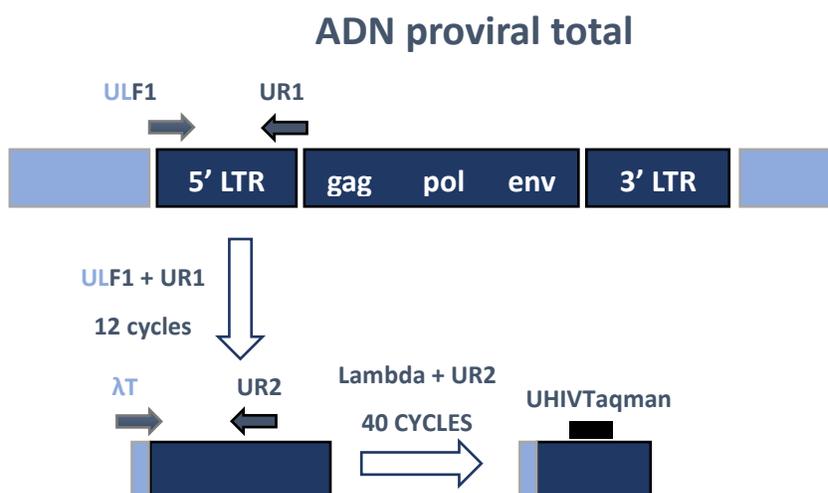


Figure 12 : Positions des amorces et des sondes utilisées. Pour la première réaction de PCR, l'ADN du VIH total a été amplifié avec une amorce spécifique de la jonction U3-R LTR portant une séquence spécifique du phage lambda (ULF1) et une amorce gag (UR1). Pour la deuxième amplification, une amorce spécifique à Lambda T (λ T) et d'une amorce spécifique de la région LTR U5 (UR2) ont été utilisées en même temps qu'une sonde d'hydrolyse qui s'apparie à la région LTR R (UHIVTaqman) (adapté de Vandergeeten et al., 2014).

4. Stimulation des lymphocytes T CD4⁺ avec un analogue de la prostratine

4.1 Isolement des Lymphocytes T CD4⁺

Dans un premier temps, les PBMC ont été décongelées et incubées une nuit à 37°C, 5% CO₂. Le lendemain, nous avons procédé à un isolement des lymphocytes T CD4⁺ par sélection négative en utilisant le EasySep™ Human CD4⁺ T Cell Isolation Kit et le EasyEight EasySep magnet (STEMCELL Technologies, BC, Canada).

Au début la suspension cellulaire a été centrifugée, et le culot cellulaire a été resuspendu à raison de 5.10⁷ cellules/ml dans 0.25 - 2ml de robosep. Ensuite 50 µL de cocktail d'isolement, et 50 µL d'un mélange d'anticorps monoclonaux soit RapidSpheres™ sont ajoutés par ml d'échantillon, les cellules autres que lymphocytes T CD4⁺ vont se lier aux billes.

Par la suite, les tubes contenant le mélange ont été placés dans l'aimant (EasyEight EasySep magnet) et ont été incubés 5 minutes à température pièce. Ensuite, le surnageant, qui ne contient que les lymphocytes T CD4⁺, a été pipeté et transféré dans un nouveau tube.

4.2 Stimulation des LTCD4⁺ à la prostratine

Les lymphocytes T CD4⁺ isolés ont été comptés et centrifugés. Ensuite, les culots ont été resuspendus à raison de 1.10⁷ cellules/ml dans du R10 supplémenté avec 1000 UI/ml d'IL-2 et 50 nM d'un analogue de la prostratine (analogue SUW013) (Beans et al., 2013). Ensuite, le mélange a été incubé 48h à 37°C, 5% CO₂.

Après incubation, nous avons récolté les surnageants de stimulation. En fait, la suspension cellulaire a été transférée dans des cryotubes et a été centrifugée. Le surnageant a été récolté et filtré sur un filtre Millex®-HV 0.45µm (Millipore Sigma, Allemagne) dans un nouveau tube, et par la suite a été congelé à -80°C.

4.3 Quantification des surnageants de stimulation à la prostratine

Les surnageants des stimulations ont été envoyés au Laboratoire national des services de référence du VIH de l'Agence de santé publique du Canada (ASPC). La quantification de l'ARN

viral a été effectuée par la technique de droplet digital PCR: en utilisant 2 appareils : le QX200™ Droplet Generator et le QX200™ Droplet Reader (Bio-Rad, QC, Canada).

Les résultats de la stimulation à l'analogie de la prostratine sont exprimés en Log_{10} copies d'ARN viral/ 10^6 lymphocytes T CD4⁺.

5. Graphiques et statistiques

Le traitement des données, les statistiques ainsi que les graphiques ont été tous générés à l'aide du logiciel GraphPad Prism version 7 (GraphPad Software, La Jolla, CA). Les corrélations obtenues sont considérées significatives lorsque la valeur de p est inférieure à 0,05.

6. Définitions

Pour mieux interpréter les résultats et les corrélations obtenus, on a défini au laboratoire certains paramètres, soit : le PLEC, le PLUS, le cPLEC et le cPLUS (Figure 13).

PLEC "proportion of life under effective cART": Correspond à la dernière proportion de vie sous TARc efficace. Un PLEC de 0 stipule que le patient avait une charge virale détectable au moment de la visite. La formule utilisée pour le calcul des PLEC est la suivante :
(date de la visite de l'étude - date du début de la TARc efficace) / (date de la visite - date de la naissance).

cPLEC "cumulative proportion of life under effective cART": Correspond à la proportion de vie cumulative sous thérapie efficaces. Le calcul déduit tous les intervalles sous TARc efficaces et la divise par l'âge à la visite d'étude, soit;

La durée totale de toutes cTAR efficaces/ (date de la visite - date de la naissance).

PLUS "proportion of life under viral suppression": Correspond à la dernière proportion de vie sous SVS. Un PLUS de 0 stipule que le patient avait une charge virale détectable au moment de la visite. Soit;

(date de la visite de l'étude - date du début de la SVS) / (date de la visite - date de la naissance).

cPLUS "cumulative proportion of life under viral suppression": Correspond à la proportion de vie cumulative sous SVS. Le calcul fait la somme de tous les intervalles sous SVS et la divise par l'âge à la visite d'étude. Soit;

La durée totale sous SVS / (date de la visite - date de la naissance). À noter que la période de vie écoulée avant les premières données valables est considérée comme non SVS.

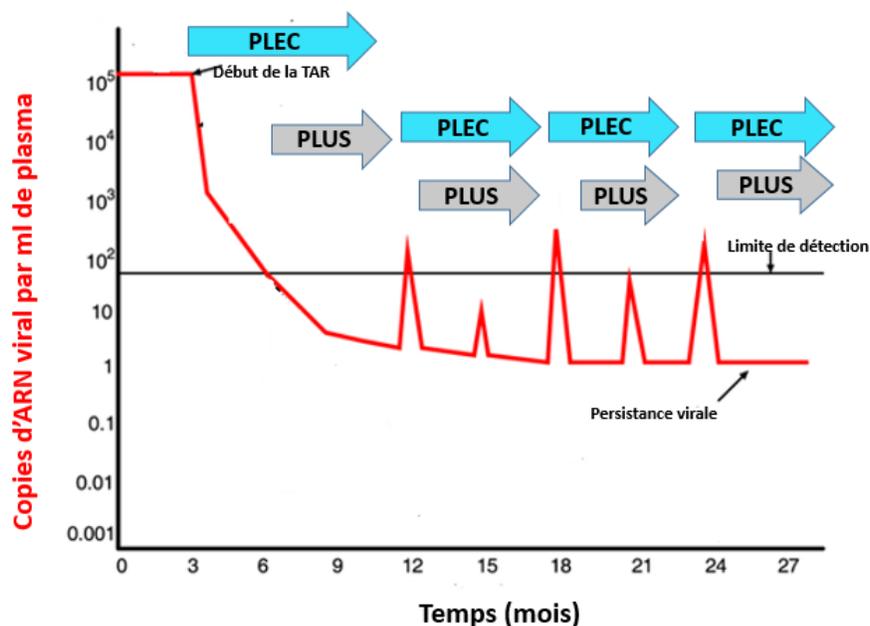


Figure 13 : présentation schématique des paramètres PLEC et PLUS.

Pour cette étude, les participants sont considérés en SVS du moment où deux charges virales consécutives sont en dessous de la limite de détection. La SVS n'est plus maintenue si deux charges virales consécutives sont détectables, ou bien si une charge virale en dessous de 10,000 copies/ ml plasma est détectée. Aussi, seuls les candidats sous TARc, utilisant 3 différents ARV ont été retenus pour cette étude. Par ailleurs, on désigne par un "Blip virologique", une charge virale détectable entre deux mesures indétectables.

TROISIÈME CHAPITRE :

RÉSULTATS

1. Quantification et évaluation de l'impact des traitements précoces sur les réservoirs lymphocytaires sanguins

1.1. Caractéristiques de la population étudiée

Au total, 134 enfants ont été inclus dans cette analyse. 51.5% des enfants sont de sexe féminin et 48.5% sont de sexe masculin. Dans ce groupe d'enfants, la médiane de l'âge au moment de la visite était de 13.5 ans (IQR 9.1, 17.2), l'âge médian à l'initiation de la TARc était de 2.7 ans (IQR 0.44, 6.4) et la durée médiane de SVS était de 6.1 ans (IQR 2.4, 9.5). De plus, 47% des enfants étaient nés au Canada, contre 53 % d'enfants nés en dehors du Canada. Les participants étaient de différentes ethnies, soit: 61.27 % d'origine Africaines / Caraïbes / Noires, 11.44% de blancs, 10.07% autochtones et 17.22% de différentes autres ethnies.

Les valeurs de PLEC obtenues avaient une médiane de 0.51 (IQR 0.19, 0.78), et les cPLEC avaient une médiane de 0.56 (IQR 0.3, 0.86). Quant aux PLUS, la médiane était de 0.42 (IQR 0.15, 0.70). Finalement, la médiane des cPLUS était 0.48 (IQR 0.27, 0.76).

Paramètre	134 enfants
Sexe masculin (%)	48.5%
Âge au moment de la visite	13.5 ans (IQR 9.1, 17.2)
Âge à l'initiation de la TARc (années)	2.7 ans (IQR 0.44, 6.4)
Âge à la SVS (années)	6.1 ans (IQR 2.4, 9.5).
Canadien de naissance (%)	47%
PLEC	0.51 (IQR 0.19, 0.78)
cPLEC	0.56 (IQR 0.3, 0.86).
PLUS	0.42 (IQR 0.15, 0.70)
cPLUS	0.48 (IQR 0.27, 0.76)

Tableau 2 : Caractéristiques de base des participants.

1.2. Corrélations entre l'âge de l'initiation de la TARc et les paramètres: PLEC, PLUS, cPLEC et cPLUS

Afin de mieux comprendre l'effet de l'initiation précoce de la TARc sur le contrôle de la charge virale et l'efficacité de la thérapie, on a choisi dans un premier temps d'étudier les corrélations entre le moment de l'initiation de la TARc et les paramètres, PLEC, PLUS, cPLEC et cPLUS. On a obtenu des corrélations négatives très significatives ($p < 0.001$) entre l'âge au premier traitement et ces différents paramètres (Figure 14).

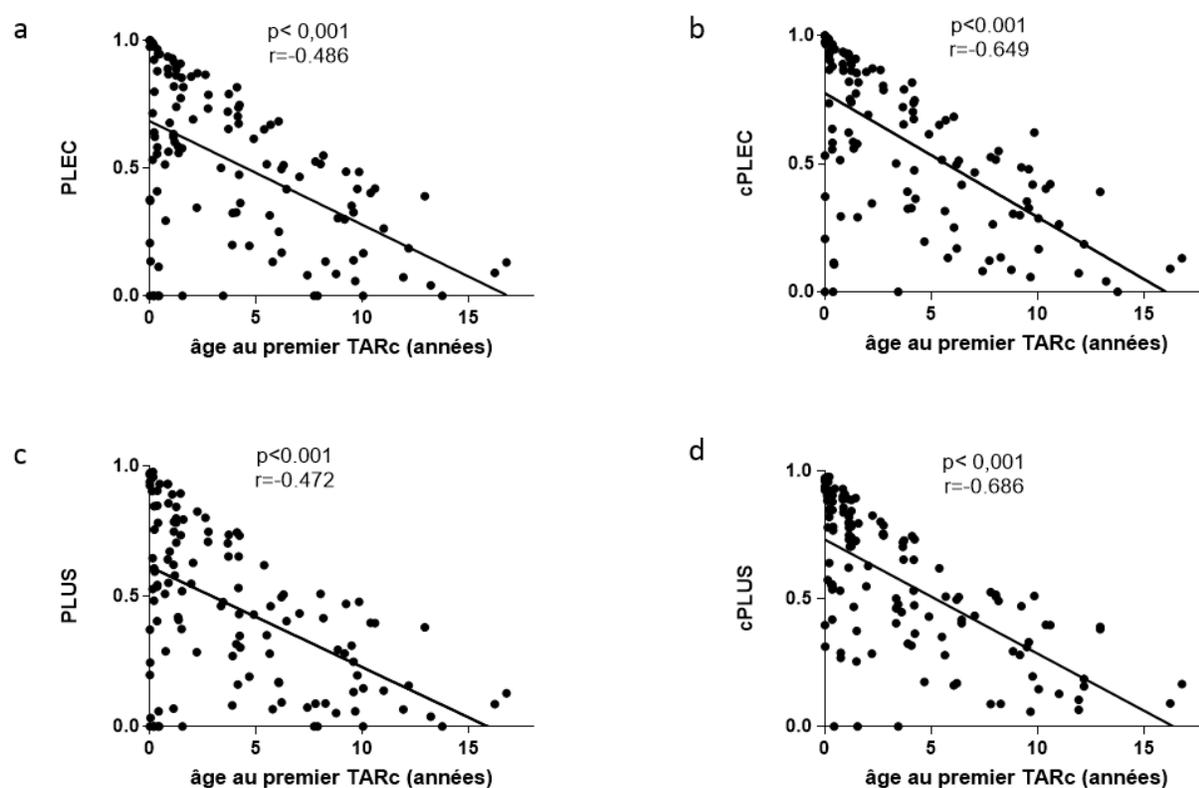


Figure 14 : PLEC (a), cPLEC (b), PLUS (c) et cPLUS (d) en fonction de l'âge à l'initiation de la TARc. Le test de corrélation utilisé est le test de Spearman pour données non-paramétriques.

En effet, PLEC et cPLEC sont inversement corrélés à l'âge de l'initiation ($\rho = -0.49$, $p < 0.0001$; $\rho = -0.65$, $p < 0.0001$). Ainsi, des valeurs plus élevées de PLEC et cPLEC indiquent que l'enfant était sous thérapie efficace, qui a conduit une suppression virale, pour une plus grande proportion de vie, en lien direct avec l'initiation précoce de la thérapie. Également, PLUS et cPLUS corrélaient négativement avec l'âge de l'initiation ($\rho = -0.47$, $p < 0.0001$; $\rho = -0.69$,

$p < 0.0001$). Autrement, une TARc précoce est associée à un meilleur contrôle la virémie et à un maintien de la SVS pour une plus grande proportion de sa vie.

1.3. Corrélations entre la taille du réservoir et les paramètres: PLEC, PLUS, cPLEC et cPLUS

Pour mesurer la taille du réservoir lymphocytaire sanguin chez les patients, on a utilisé deux techniques, celle de la quantification de l'ADN VIH total dans les cellules sanguines périphériques par PCR en temps réel, qui corrèle chez les patients traités avec la quantification de l'ADN VIH intégré. Et aussi avec la quantification du niveau d'ARN viraux inductibles dans les lymphocytes T CD4⁺ stimulés avec un analogue de prostratine.

Dans le but d'établir des liens entre l'historique du traitement et la taille du réservoir, on a testé les corrélations entre la quantification de l'ADN proviral, le PLEC, le cPLEC, le PLUS et le cPLUS (Figure 15).

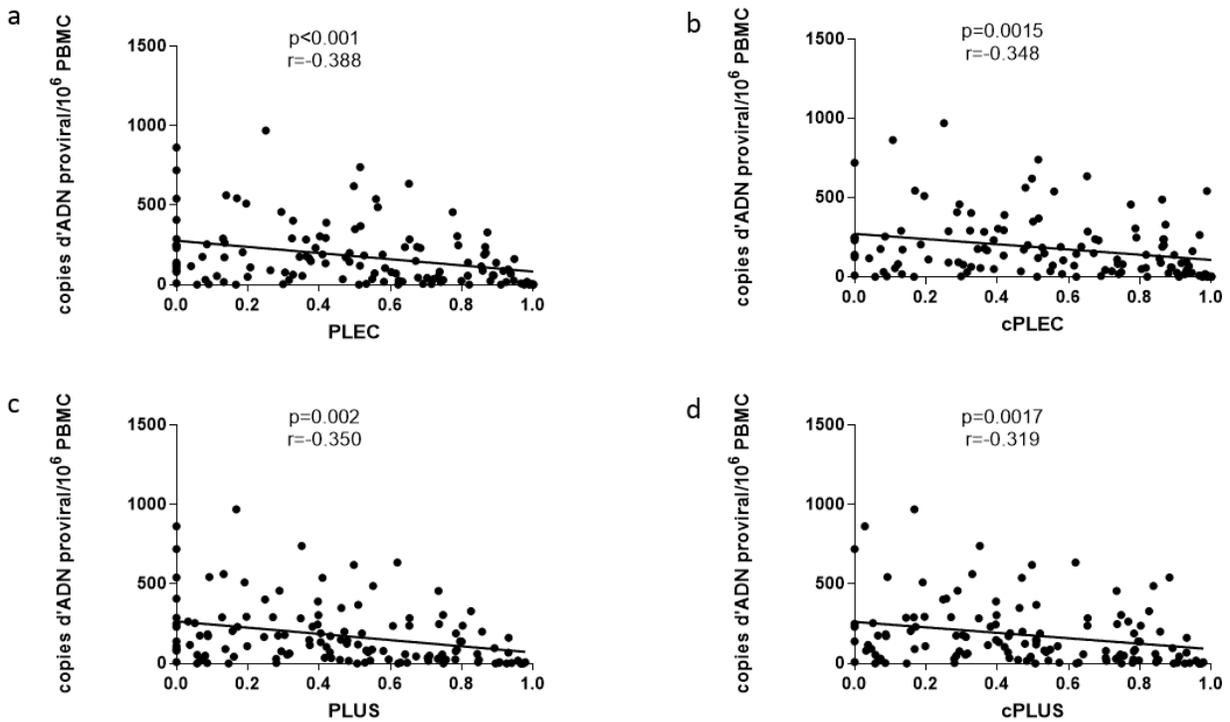


Figure 15 : Taille du réservoir viral en ADN proviral mesurée par PCR en temps réel et exprimée en copies / 10^6 PBMC, en fonction de: PLEC (a), cPLEC (b), PLUS (c) et cPLUS (d). Le test de corrélation utilisé est le test de Spearman pour données non-paramétriques.

Le PLEC et le cPLEC sont négativement corrélés à la taille du réservoir viral mesuré ici en ADN proviral ($\rho = -0.39$, $p < 0.0001$; $\rho = -0.35$, $p = 0.0015$). Ainsi, une plus grande proportion et durée de vie sous TARc efficace est associée à des niveaux plus bas du réservoir viral. Autrement dit, une thérapie non efficace c.a.d., menant à un rebond viral, viendrait nourrir et étendre ta taille du réservoir viral. De même, le PLUS et le cPLUS corrént négativement avec la quantité de l'ADN proviral ($\rho = -0.35$, $p = 0.002$; $\rho = -0.32$, $p = 0.0017$), ce qui signifie qu'une plus grande proportion et durée de vie sous SVS est corrélée à un réservoir plus petit.

Ces mêmes corrélations sont confirmées pour le réservoir inductible, quantifié en mesurant l'ARN viral provient après stimulation par un analogue la prostratine des lymphocytes T CD4⁺ et le PLEC, le cPLEC, le PLUS et le cPLUS ($\rho = -0.40$, $p < 0.0001$; $\rho = -0.38$, $p < 0.0001$; $\rho = -0.38$, $p < 0.0001$; $\rho = -0.33$, $p = 0.0003$) (Figure 16). À noter que les résultats de la stimulation à la prostratine sont obtenus auprès de 113 enfants sur les 133 participants au total.

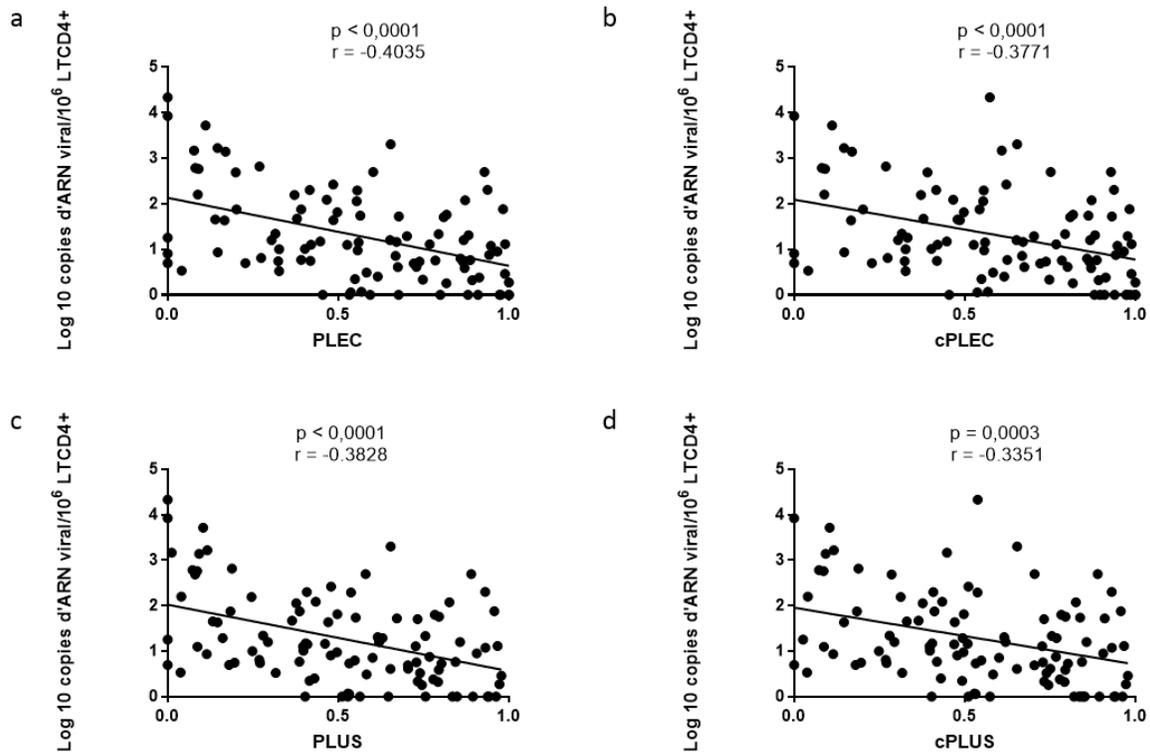


Figure 16 : Taille du réservoir viral inductible mesurée en Log₁₀ de copies d'ARN viral produit par les lymphocytes T DC4⁺ stimulés par un analogue de la prostratine, en fonction du: PLEC (a), cPLEC (b), PLUS (c) et cPLUS (d). Le test de corrélation utilisé est le test de de Spearman pour données non-paramétriques.

1.4. Impact du moment de l'initiation sur la taille du réservoir viral lymphocytaire sanguin

1.4.1. Stratification et caractéristiques des groupes

Afin de mieux décortiquer l'effet de l'initiation précoce de la TARc sur le réservoir, nous avons stratifié nos patients en 2 groupes: un premier groupe ayant commencé la TARc avant l'âge de 6 mois et ayant affiché un bon contrôle de la virémie, soit le groupe A (17 enfants) et le second groupe ayant commencé la TARc après l'âge de 6 mois, soit le groupe B (92 enfants). Cette subdivision est inspirée de l'article de notre collaborateur Ari Bitnun et auquel j'ai participé comme coauteur (Bitnun et al., 2019) (voir annexe).

L'âge médian à l'initiation de la TARc était de 0.2 ans (IQR 0.11, 0.23) pour le groupe A versus 4.2 ans (IQR 1.5, 8.3) pour le groupe B. Les caractéristiques de base des participants, par groupe, sont décrites dans le Tableau 1. Sommairement, les individus du groupe A avaient tendance à être plus jeunes et nés au Canada que ceux du groupe B. Cela dit, on n'a pas noté de différence en fonction du sexe entre les deux groupes. Les CD4 nadirs de % CD4 étaient significativement plus élevés dans le groupe A : 28 (IQR 17, 32) Versus 19.5 (12, 27) ($p=0.029$) suggérant une meilleure restauration immunitaire pour le groupe A.

Comme attendu, le groupe A présentait des durées et des proportions de vie significativement plus élevées sous TARc effective. En effet, la médiane de la durée totale sous TARc effective est de 10.37 ans (IQR 7.81, 12.72) pour le groupe A Versus 7 ans (IQR 2.76, 10.08) pour le groupe B. Aussi, la médiane de cPLEC est de 0.967 (IQR 0.87, 0.99) pour le premier groupe contre 0.51 (IQR 0.29, 0.75) pour le second groupe. De la même façon, le groupe traité précocement affichait des durées et des proportions de vie sous SVS plus grandes, soit une médiane de durée totale sous SVS de 9.34 ans (IQR 7.21, 12.25) versus 5.23 ans (IQR 2.32, 9.15), et une médiane de cPLUS de 0.88 (IQR 0.84, 0.93) versus 0.43 (IQR 0.25, 0.70). Fait intéressant, la SVS était atteinte plus rapidement dans le premier groupe, avec une médiane de 7.13 mois après l'initiation de la TARc pour le groupe A et 19.43 mois pour le groupe B ($p < 0,0001$).

Ces constats viennent appuyer nos précédentes observations: un traitement initié plus précocement corrèle avec une meilleure efficacité de la thérapie et avec un meilleur contrôle de la charge virale.

Paramètre	Groupe 1 (n=10)	Groupe 2 (n=30)	Valeur de P
Âge courant (années)	10.67 (IQR 8.41, 13.24)	14.32 (IQR 10.15, 17.82)	0.001
Sexe masculin (%)	41	47.83	0.614
Ethnie (%)			
Africains/ noirs (%)	41.1	66.3	0.049
Blancs (%)	17.6	10.87	0.428
Autochtones (%)	23.5	5.43	0.013
Autres (%)	17.6	17.39	0.980
Canadien de naissance (%)	94	32.61	< 0,0001
Compte CD4 (cellules/ μ L)	767	701	0.2
CD4 nadir (%)	28 (IQR 17, 32)	19.5 (IQR12, 27)	0.029
Âge à l'initiation de la TARc (années)	0.2 (IQR 0.11, 0.23)	4.2 (IQR 1.5, 8.3)	< 0,0001
Âge à la SVS (années)	1.114 (IQR 0.39, 1.74)	7.764 (IQR4.30, 11.8)	< 0,0001
Durée de SVS (années)	9.34 (IQR 7.21, 12.25)	5.23 (IQR 2.32, 9.15),	0.0037
Proportion cumulative de la vie sous cART efficace (cPLEC)	0.967 (IQR 0.87, 0.99)	0.51 (IQR 0.29, 0.75)	0,0001
Proportion cumulative de la vie sous SVS (cPLUS)	0.88 (IQR 0.84, 0.93)	0.43 (IQR 0.25, 0.70)	0,0001

Tableau 3 : Caractéristiques de base des participants par groupe.

1.4.2. Corrélations entre la taille du réservoir et l'âge d'initiation de la TARc

Par la suite, il est pertinent de comparer les niveaux du réservoir viral entre les deux groupes.

La taille du réservoir du VIH-1, mesurée en ADN proviral dans les PBMC, était significativement plus faible dans le groupe A comparé au groupe B, avec respectivement une médiane de 12.12 copies d'ADN proviral/ 10^6 PBMC (IQR 5.48, 24.17) soit une médiane de 1 Log_{10} copies d'ADN viral/ 10^6 PBMC (IQR 0.72, 1.38) contre une médiane de 143.6 copies d'ADN proviral/ 10^6 PBMC (IQR 68.2, 288) soit 2.16 Log_{10} copies d'ADN viral/ 10^6 PBMC (IQR 1.8, 2.4) ($p < 0.0001$) (Figure 17).

La même différence significative a été observée après stimulation avec un analogue de prostratine. La taille du réservoir inductible dans les lymphocytes CD4^+ était nettement plus basse chez le groupe ayant adhéré plus précocement à la TARc, avec une médiane de 0.45 Log_{10} copies d'ARN viral/ 10^6 lymphocytes T CD4^+ (IQR 0, 1.04) contre une médiane de 1.17 Log_{10} copies d'ARN viral/ 10^6 lymphocytes T CD4^+ (0.74, 1.84) mesurée chez le second groupe ($p < 0.0001$).

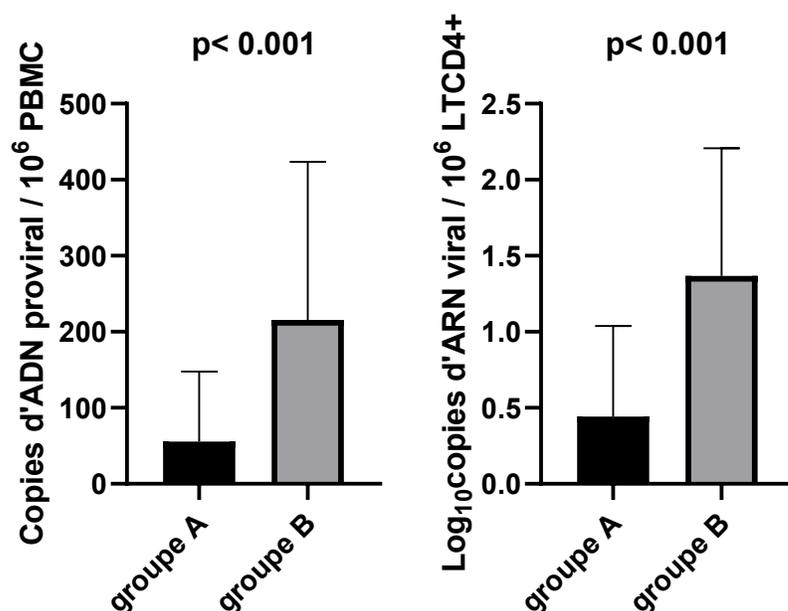


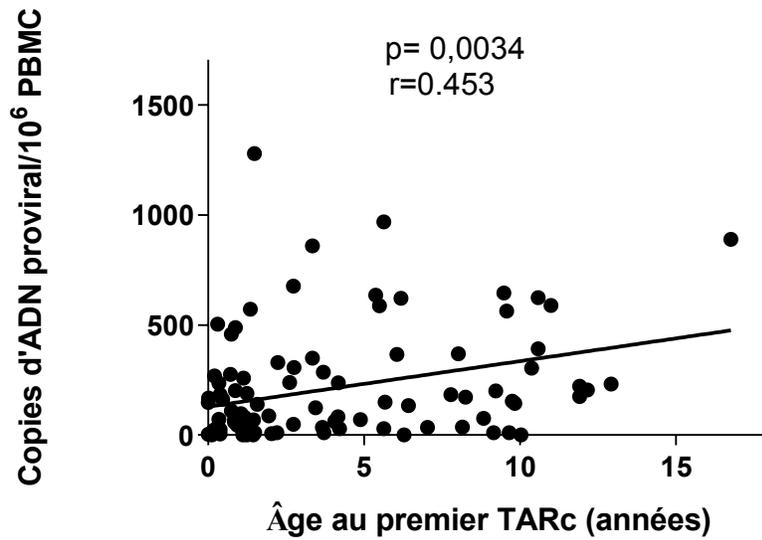
Figure 17 : Comparaison de la taille du réservoir lymphocytaire sanguin chez les enfants traités avant 6 mois d'âge (groupe A) versus enfants traités après 6 mois d'âge (groupe B).

À gauche: ADN proviral mesuré par PCR en temps réel et exprimé en copies / 10⁶ PBMC. À droite: quantification de l'ARN viral dans les lymphocytes T CD4⁺ stimulés avec un analogue de prostratine. Le test utilisé est le test de Mann Whitney.

Pour mieux visualiser l'effet direct de l'âge à l'initiation sur la taille du réservoir, nous avons examiné, dans un ensemble de la cohorte, les corrélations directes entre ces deux paramètres (Figure 18). Les niveaux d'ADN proviral mesurés dans les PBMC corrént directement, positivement et significativement avec l'âge à l'initiation ($\rho=0.342$, $p=0.005$) utilisant un test de Spearman pour données non-paramétriques.

Pareillement, les niveaux d'ARN viral inductible dans les lymphocytes T CD4⁺ après stimulation corrént positivement et d'une manière significative et robuste avec l'âge à l'initiation ($\rho= 0.3005$, $p=0.0008$). Ensemble, ces résultats suggèrent une association entre l'adhérence précoce au TARc après la naissance et l'altération de l'établissement des réservoirs, limitant ainsi la taille du pool lymphocytaire quiescent infecté.

a



b

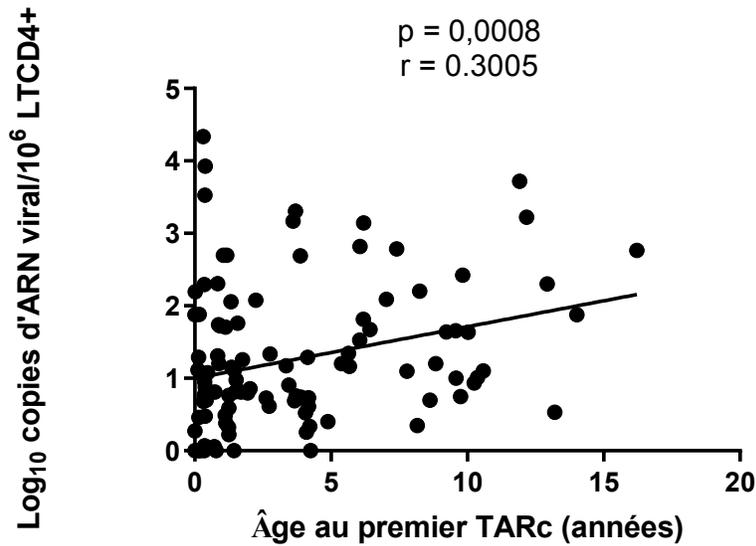


Figure 18 : Taille du réservoir lymphocytaire sanguin en fonction de l'âge de l'initiation de la TARc effective. a: la taille du réservoir mesuré en ADN proviral et exprimé en copies / 10⁶ PBMC. b: taille du réservoir inductible quantifié en ARN viral dans les lymphocytes T CD4⁺ stimulés avec un analogue de prostratine. Le test de corrélation utilisé est le test de Spearman pour données non-paramétriques.

1.4.3. Corrélations entre la taille du réservoir et l'âge à la SVS

Par la suite, nous avons examiné les relations entre la taille du réservoir et l'âge auquel la suppression virale était atteinte (Figure 19). Les taux de l'ADN proviral mesurés dans les PBMC corrélaient positivement et significativement avec l'âge à la suppression ($\rho=0.219$, $p=0.022$). Un résultat similaire a été obtenu avec le réservoir inducible ($\rho=0.216$, $p=0.028$), utilisant un test de Spearman.

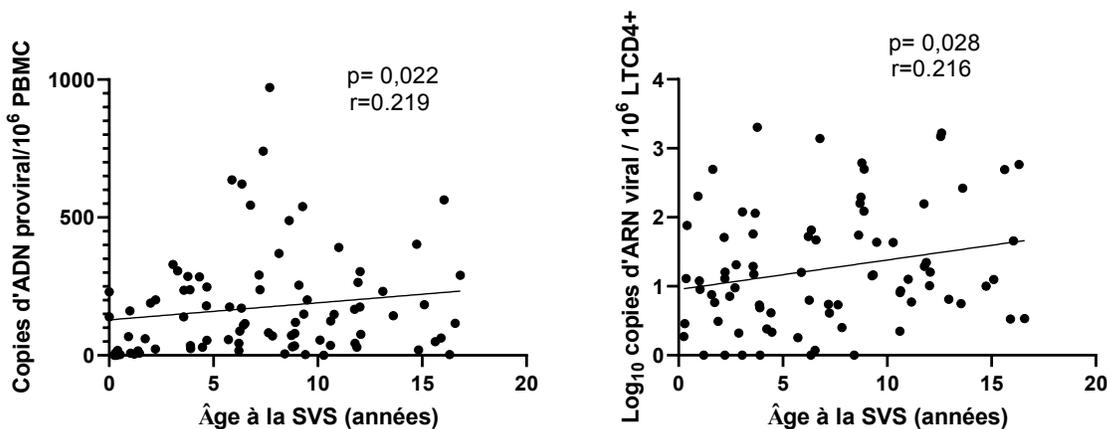


Figure 19 : Taille du réservoir lymphocytaire sanguin en fonction de l'âge à l'atteinte de la SVS. À gauche: la taille du réservoir mesuré en ADN proviral et exprimé en copies / 10⁶ PBMC. À droite: taille du réservoir inducible quantifié en ARN viral dans les lymphocytes T CD4⁺ stimulés avec un analogue de prostratine. Le test de corrélation utilisé est le test de Spearman pour données non-paramétriques.

1.5. Corrélation entre la taille du réservoir et les comptes de CD4⁺ des patients

Afin de mesurer l'effet de l'initiation précoce sur la restauration immunitaire, nous avons mesuré les corrélations entre la taille du réservoir et le compte courant des lymphocytes T CD4⁺ chez les participants (Figure 20). Nous avons observé une corrélation négative significative entre la quantité d'ADN proviral et les comptes de CD4 ($\rho=-0.158$; $p=0.037$). Autrement dit, une déplétion des lymphocytes T CD4⁺ était associée à une taille du réservoir plus élevée, et réciproquement. Donc, mis à part le bénéfice qu'offre la TARc initiée précocement après la naissance quant à la taille du réservoir, elle serait aussi associée à une meilleure restauration

immunitaire chez le patient. Cependant, la corrélation entre la quantité d'ARN inductible associé au lymphocytes T CD4⁺ et le compte CD4 avait la même tendance, mais n'était pas statistiquement significative ($\rho = -0.035$; $p = 0.37$).

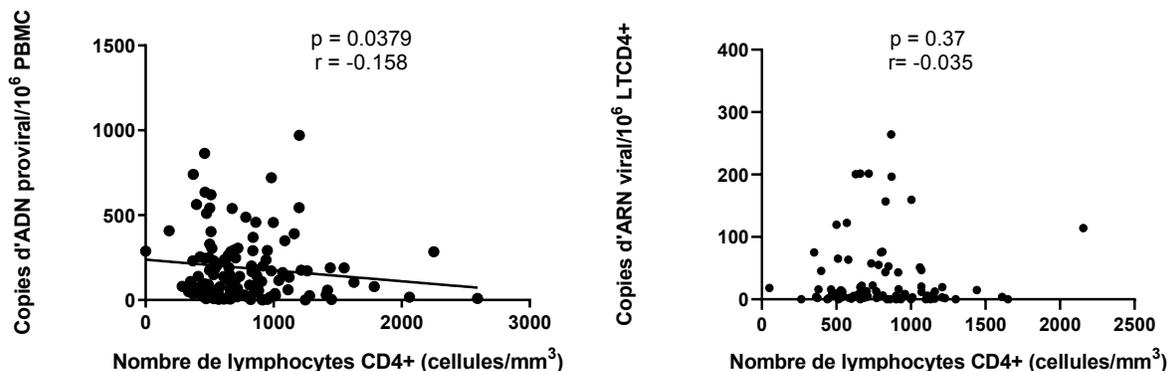


Figure 20 : Taille du réservoir lymphocytaire sanguin en fonction du compte courant des Lymphocytes T CD4⁺. À gauche: Taille du réservoir mesuré en ADN proviral et exprimé en copies / 10⁶ PBMC. À droite: taille du réservoir inductible quantifié en ARN viral dans les lymphocytes T CD4⁺ stimulés à un analogue de prostratine. Le test de corrélation utilisé est le test de Spearman.

En ce qui concerne la taille du réservoir viral lymphocytaire sanguin chez l'enfant comparé à celui de l'adulte, nos données permettent d'avancer qu'il serait plus petit. En effet, les valeurs médianes de la quantification de l'ADN proviral chez les adultes, dans la littérature, sont aux alentours de 1000 copies / 10⁶ PBMC, comparé à une médiane de 116.5 copies / 10⁶ PBMC (IQR 38.54, 249.27 copies / 10⁶ PBMC) obtenue chez les enfants de notre cohorte ($n=133$).

1.6. Corrélation entre la taille du réservoir mesurée en ADN proviral total et ARN inductible après stimulation à la prostratine

Durant notre étude nous avons utilisé un nouveau test basé sur la stimulation avec un analogue de la prostratine (SUW013) (Beans et al., 2013), pour mesurer la taille du réservoir inductible dans les lymphocytes T CD4⁺ des participants. Récemment, une corrélation robuste entre la taille du réservoir inductible utilisant cette technique et la taille du réservoir obtenue en

QVOA était démontrée (Beans et al., 2013). Afin d'évaluer la pertinence de ce test, nous avons établi le lien entre les résultats obtenus et ceux obtenus en ADN proviral (Figure 21).

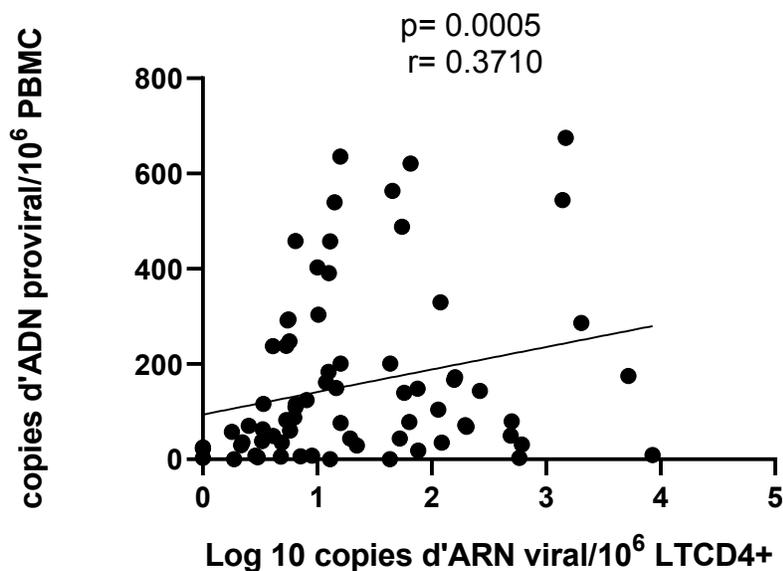


Figure 21 : Corrélation de la taille du réservoir viral mesurée en ADN proviral dans les PBMC et en ARN viral inductible après stimulation des lymphocytes T CD4⁺ par un analogue de la prostratine. Le test de corrélation utilisé est le test de Spearman.

Une corrélation positive statistiquement significative entre les niveaux du réservoir mesurés en ADN proviral et les taux d'ARN viral induits dans les lymphocytes T CD4⁺ a été rapportée ($\rho = 0.371$; $P = 0.0005$; Figure 21). Cette corrélation était particulièrement forte pour les enfants du groupe A (ayant initié le traitement avant l'âge de 6 mois), avec un $\rho = 0.650$ ($p = 0.012$) Versus $\rho = 0.276$ ($p = 0.030$) pour le groupe B (ayant adhéré au TARc après 6 mois d'âge).

QUATRIÈME CHAPITRE :
DISCUSSION

L'introduction de la TARc en 1996 s'est avérée très efficace. La TARc permet de réduire de façon considérable la charge virale plasmatique du VIH-1, jusqu'à un niveau indétectable. Malheureusement, une éradication complète du virus n'est pas envisageable à cause de la persistance du VIH intégré sous forme latente dans ses principales cellules cibles, notamment dans les lymphocytes T CD4⁺. Une meilleure compréhension de la persistance du VIH dans les réservoirs est essentielle vu les importantes implications thérapeutiques qui en découlent. Compte tenu du fait que le système immunitaire chez la population infantile soit en développement, il est d'une importance capitale d'étudier les réservoirs de VIH spécifiquement dans cette population.

Mon travail de maîtrise s'inscrit dans le cadre de l'étude EPIC⁴. À notre connaissance, c'est l'étude avec le plus grand nombre d'enfants infectés par voie verticale au Canada. Nous considérons qu'il s'agit d'une population idéale pour étudier et comprendre les conditions associées avec les différents niveaux du réservoir viral pouvant servir à la conception des futurs essais thérapeutiques visant la rémission du VIH-1.

Pour évaluer l'impact de l'initiation précoce de la TARc sur le réservoir, nous avons utilisé deux techniques, celle de la quantification de l'ADN VIH total dans les cellules sanguines périphériques par PCR en temps réel, qui corrèle chez les patients traités avec la quantification de l'ADN VIH intégré, et la quantification de l'ARN inducible dans les lymphocytes T CD4⁺ après stimulation à un analogue de la prostratine. Nous avons démontré dans un premier temps que la taille du réservoir viral dans le sang périphérique, mesurée en ADN proviral et en ARN inducible, corrèle directement à la fois avec l'âge à l'initiation de la TARc et l'âge à la suppression virale. Ces résultats sont cohérents avec ceux rapportés par trois autres études (Persaud et al., 2014; Martinez-Bonet et al. 2015; Kuhn et al., 2018), qui ont assimilé qu'un traitement initié précocement après la naissance protégerait le système immunitaire et altérerait la formation du réservoir viral, limitant ainsi sa taille.

Similairement aux résultats reportés récemment par l'étude EPIICAL (Tagarro et al., 2018), nous avons observé une forte corrélation négative entre la taille du réservoir viral mesurée à l'aide des deux techniques utilisées, avec la proportion de la vie sous TARc effective et la proportion de la vie sous SVS, ce que nous avons désigné ici par cPLEC et cPLUS. Ainsi, une plus grande proportion de vie sous thérapie efficace est associée avec une taille plus limitée du réservoir. En effet, une thérapie non efficace, c.a.d. menant à un rebond viral, viendrait

nourrir et étendre le réservoir viral. De la même façon, une plus grande proportion et durée de vie sous SVS est corrélée à un réservoir plus réduit.

Dans une même optique, nous avons obtenu des corrélations négatives significatives entre l'âge au premier traitement, le cPLEC et le cPLUS. Ainsi, un traitement initié plus précocement permet au patient d'avoir une plus grande proportion de vie sous thérapie efficace, conduisant à une SVS pendant une proportion de vie beaucoup plus importante, donc un meilleur contrôle de la charge virale et une meilleure efficacité de la thérapie. En effet, définir le lien entre le moment de l'initiation de la TARc, la taille du réservoir et la durée de la suppression virale est critique. Nous avançons que l'initiation précoce de la TARc et le maintien à long terme de la SVS sont des facteurs clés conduisant à une taille limitée du réservoir viral (Kuhn et al., 2018; Tagarro et al., 2018).

Afin de mieux analyser les différents facteurs associés avec les différents niveaux du réservoir viral, nous avons stratifié nos patients en 2 groupes : un premier groupe ayant commencé la TARc avant l'âge de 6 mois et ayant un bon contrôle de la virémie et le second groupe ayant commencé la TARc après l'âge de 6 mois.

Nous avons mis en évidence que les nourrissons traités dans les premiers 6 mois de vie ont atteint la suppression virale en moyenne 7 mois après le début de la TARc contre une moyenne de 19.5 mois chez les sujets traités plus tard. Également, chez ce groupe de nourrissons, le nadir du pourcentage de CD4 étaient significativement supérieurs, tandis que les pourcentages de CD4 avaient la même tendance, mais moins significative. Ainsi nous suggérons qu'un traitement initié dans les premiers six mois de vie est associé à une suppression virale plus rapide. Nos résultats sont cohérents avec les conclusions générales de l'étude EPPICC (Chan et al. 2019). Cette étude a permis d'avancer que la TARc initiée dans les premiers six mois de vie est un facteur de prédiction d'une SVS plus rapide, pour cette cohorte formée de 420 enfants, la plupart des nourrissons qui ont atteint la SVS dans 12 mois après le début du traitement par TARc. Cette même étude suggère qu'un pourcentage plus élevé de CD4 et un \log_{10} de la charge virale plus bas, étaient également des facteurs de prédiction indépendants d'une suppression virale plus rapide.

Quelques essais randomisés et cohortes ont mis en évidence le fait qu'un traitement initié précocement après la naissance déterminerait un contrôle plus rapide de la réplication virale. Citons principalement l'étude EIC, qui a montré que la SVS est établie plus rapidement chez les

nourrissons commençant une TARc avant l'âge de 3 mois, comparés aux nourrissons traités plus tard (Goetghebuer et al., 2011). Dans une autre étude (n = 128) effectuée chez des enfants africains plus âgés (1.7 à 13.5 ans), les enfants âgés de moins de 8 ans avaient de plus fortes probabilités d'atteindre la SVS par rapport aux enfants plus âgés (Bienczak et al., 1999). Aussi, Shiau et ses collaborateurs ont reporté que l'initiation de la TARc avant l'âge de 6 mois était associée à un meilleur contrôle immunovirologique après la suppression initiale chez les bébés infectés par le VIH (Shiau, 2017).

Les raisons pour lesquelles le moment de l'initiation du TARc serait critique pour suppression virale demeurent pas claires. Cela dit, il y a de bons arguments virologiques et immunologiques justifiant qu'un individu avec des niveaux inférieurs de virus circulant supprimerait plus rapidement. En effet, et comme on a déjà vu dans l'introduction, après l'initiation de TARc, la charge virale plasmatique diminue en plusieurs phases. La première phase du déclin est associée à une perte rapide des lymphocytes T CD4⁺ activés à courte demi-vie, qui est suivie par la perte plus lente de cellules infectées à plus longue demi-vie. Enfin, il y a la perte beaucoup plus lente de cellules infectées de manière latente (Palmer et al., 2011). Dans le contexte de nos conclusions, nous suggérons qu'un traitement initié précocement ciblerait les cellules à demi-vie courte, ce qui pourrait avoir des implications importantes pour limiter l'établissement des réservoirs viraux. En conclusion, un contrôle plus rapide de la virémie est associé à une taille plus réduite du réservoir.

Chez le premier groupe, le niveau d'ADN proviral total est en moyenne plus de $-1 \log_{10}/10^6$ PBMC plus bas que chez les enfants traités après 6 mois d'âge. Le même résultat est observé après stimulation avec un analogue de la prostratine. Ces résultats sont similaires à ceux rapportés par d'autres études qui ont montré des différences dans les des niveaux d'ADN du VIH-1 mesurés entre les groupes d'enfants traités dans les premiers mois de la vie par rapport aux enfants traités plus tard (MacManus et al., 2016; Martinez-Bonet et al., 2015; Persaud et al., 2012). De façon très intéressante, Tagarro et ses collaborateurs ont quantifié les conséquences de chaque retard d'un mois de l'introduction de la TARc après la naissance sur la taille du réservoir (Tagarro et al., 2018). Leurs résultats montrent qu'un mois de retard de l'initiation de la TARc correspond à une augmentation de 13% de l'ADN proviral ($p = 0,009$).

À noter également que nous avons mesuré, chez les enfants qui ont commencé un TARc au cours des 6 premiers mois de vie, un niveau d'ADN proviral extraordinairement bas (<1

$\log_{10}/10^6$ PBMC), similaire à celui obtenu chez les enfants traités ultras tôt décrits par Luzuriaga et collaborateurs (Luzuriaga et al., 2014).

La plupart des études pédiatriques se sont appuyées sur des mesures de l'ADN proviral dans les PBMC pour évaluer la taille des réservoirs. Cette technique nécessite de plus petits volumes de sang. Rappelons que la quantité de sang est le facteur limitant principal dans des essais pédiatriques. Cependant, l'ADN total du VIH-1 dans les PBMC n'est pas un marqueur idéal de la taille du réservoir, car les techniques de PCR peuvent détecter jusqu'à 90% de provirus défectueux (Bruner et al., 2015; Ho et al., 2013).

Une étude a montré que sur neuf tests de VOA effectués chez les jeunes traités précocement, seulement 1 réplica sur 20 était compétent pour la réplication (Luzuriaga et al. 2014). De façon générale, de faibles corrélations entre la QVOA, qui est la technique de référence du réservoir, et les mesures d'ADN proviral ont été observées dans certaines études (Eriksson et al., 2013) mais pas toutes (Kiselinova et al., 2016).

L'originalité de notre travail est que nous avons démontré pour la première fois que la taille du réservoir inductible du VIH-1 mesurée dans lymphocytes T CD4⁺ du sang périphérique après stimulation avec un analogue de prostratine corrèle significativement avec celle mesurée en ADN proviral. Nous venons de publier ces résultats dans un article intitulé "Clinical correlates of HIV-1 DNA and inducible HIV-1 RNA reservoirs in peripheral blood in children with perinatally acquired HIV-1 infection with sustained virologic suppression for at least 5 years", auquel j'ai participé comme coauteure (Bitnun et al., 2019) (voir annexe).

Dans cette étude, nous nous sommes intéressés à 69 enfants de la cohorte EPIC⁴ qui présentaient la particularité de maintenir la SVS pour plus de 5 ans. Les enfants ont été stratifiés en deux groupes selon le moment de l'initiation de la TARc: un premier groupe d'enfants traités avant l'âge de 6 mois et qui ont atteint la SVS dès la première TARc et un second groupe d'enfants traités après l'âge de 6 mois.

Nos résultats ont montré que la corrélation entre les niveaux du réservoir obtenus par les deux techniques de mesure employées était encore plus robuste parmi le groupe d'enfants qui ont été traités très tôt: ils ont atteint la SVS, n'ont pas eu de "blips virologiques" et ont montré des charges virales indétectables. La forte corrélation entre les 2 tests dans ce sous-ensemble d'enfants peut s'expliquer par le fait que dans ce groupe, la réplication virale cumulative était à son plus faible niveau, ce qui pourrait avoir limité à la fois la taille du réservoir

et l'accumulation des génomes défectueux. Autrement, on en conclut aussi que les blips virologiques peuvent être associés à des effets prolongés et de faible intensité sur la réplication virale, avec une augmentation progressive de la proportion de génomes défectueux.

Nous avons montré que la taille du réservoir inductible du VIH-1 dans les lymphocytes T CD4⁺ du sang périphérique peut être estimée chez les enfants en utilisant un test de stimulation avec un analogue de la prostratine, et que les résultats de ce test corrélaient avec les niveaux d'ADN proviral. Le dosage du réservoir inductible après stimulation à la prostratine requiert un faible volume de sang. Cette technique pourrait ainsi s'avérer précieuse pour estimer le réservoir viral compétent à la réplication chez les enfants.

Par ailleurs, nous avons observé une forte corrélation négative entre les niveaux d'ADN proviral et les comptes de lymphocytes T CD4⁺. Une même tendance, mais moins significative, était obtenue avec le réservoir viral inductible après stimulation à l'analogue de la prostratine. Nous concluons ainsi qu'une déplétion des lymphocytes T CD4⁺ était associée à une taille de réservoir plus élevée, et inversement. Dans ce même contexte, nous avons mesuré chez le groupe d'enfants traités avant 6 mois d'âge des pourcentages de CD4 nadir significativement plus élevés comparés avec ceux traités plus tard. Le compte courant de cellules CD4⁺ avait tendance à être plus élevé dans le premier groupe, mais ce résultat manque de force statistique.

L'association entre une SVS plus rapide, une taille plus réduite du réservoir et compte de Lymphocytes T CD4⁺ plus élevé a été observée dans plusieurs études, que ce soit chez les nourrissons, les enfants, les femmes enceintes et les adultes (Jiamsaku et al., 2017; Prendergast et al., 2008; Mujugira et al., 2016).

L'étude CHER a permis de montrer l'importance majeure de l'initiation précoce de la TARc dans la préservation du nombre de lymphocytes T CD4⁺ (Lewis et al., 2017). En effet, cette étude a révélé qu'une TARc initiée avant 3 mois de vie a estompé la baisse du nombre de lymphocytes T CD4⁺, mais ne l'a pas complètement rétabli aux niveaux observés chez les enfants non infectés par le VIH. L'interruption de la TARc a entraîné un déclin rapide du nombre des lymphocytes T CD4⁺, qui, lors de la réintroduction du traitement, sont revenus aux niveaux observés avant l'interruption. Sommairement, Lewis et ses collaborateurs ont démontré que la TARc précoce chez les nourrissons infectés par le VIH est importante pour stabiliser le nombre de lymphocytes T CD4⁺ au niveau le plus élevé possible. Une fois stabilisés, les cellules CD4⁺ des enfants semblent résilientes et offrent un bon potentiel de récupération après une interruption

du traitement. Par ailleurs, le pool naïf de lymphocytes T et la production thymique de cellules naïves sont les facteurs déterminants des taux de cellules CD4⁺ chez les enfants (Lewis et al., 2017).

Une initiation très précoce de la TARc après la naissance, combinée à une faible charge virale et un compte élevé de lymphocytes T CD4⁺ de base serait idéale pour une reconstitution immunitaire plus rapide (Ásbjörnsdóttir et al., 2016), limitant l'ensemencement du réservoir viral et préservant l'homéostasie des lymphocytes T CD4⁺, offrant ainsi des possibilités de rémission (Palma et al., 2015).

CINQUIÈME CHAPITRE :
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

L'infection par le VIH-1 mène à la destruction des lymphocytes T CD4⁺, à une perturbation majeure de l'homéostasie lymphocytaire, à une activation immunitaire massive et chronique et à l'établissement d'un réservoir viral en primo-infection. Le réservoir est riche en cellules cibles quiescentes qui échappent au système immunitaire et aux antirétroviraux actuels et conditionnent la persistance virale à long terme.

En conclusion, nous avons démontré de manière solide que la taille du réservoir viral lymphocytaire sanguin du VIH-1 corrèle directement avec le l'âge à l'initiation de la TARc et l'âge auquel la SVS est atteinte. Les niveaux des réservoirs sont inversement corrélés à la proportion de la vie sous cART effective et proportion de la vie sous SVS et au compte de lymphocytes T CD4⁺. Nous avons montré également qu'un traitement initié dans les premiers six mois de vie est associé à une suppression virale plus rapide.

Nos résultats nous permettent de confirmer l'hypothèse que l'initiation précoce de la TARc et le maintien à long terme de la SVS sont des facteurs clés conduisant à une taille limitée du réservoir viral. Mis à part le bénéfice qu'offre la TARc initiée précocement sur la taille du réservoir, elle est aussi associée à une meilleure restauration immunitaire chez l'enfant.

Nous avons démontré pour la première fois que la taille du réservoir inductible du VIH-1 mesurée dans les lymphocytes T CD4⁺ du sang périphérique après stimulation avec un analogue de prostratine corrèle significativement avec celle mesurée en ADN proviral. Ainsi, nous avons développé et validé une technique de mesure de réservoir inductible chez l'enfant qui est rapide et moins coûteuse et surtout requiert un faible volume de sang. Nous pensons que cette technique pourrait être retenue comme méthode standard de mesure du réservoir inductible chez l'enfant.

La suite du projet comprendra deux volets qui seront exécutés par d'autres membres de notre équipe. Le premier consistera en une analyse longitudinale de l'évolution du réservoir, vu que nous avons les données et les échantillons biologiques de ces patients sur 4 ans. Il sera pertinent d'étudier l'évolution dans les temps du réservoir et de comprendre l'impact de l'âge à l'initiation de la TARc sur cette évolution.

Le deuxième volet consistera à étudier la distribution précoce du réservoir lymphocytaire sanguin et l'impact de l'initiation précoce de la TARc sur l'homéostasie lymphocytaire chez l'enfant. Un isolement des différentes sous-populations de lymphocytes T CD4⁺ sera réalisé par un tri cellulaire pour séparer les populations naïves, les TCM, les TTM et les TEM. La taille du

réservoir viral sera mesurée et comparée dans ces différentes sous-populations. On s'attend à ce que l'initiation ultra précoce de la TARc après la naissance préserve les sous-populations lymphocytaires T CD4⁺ TCM et naïves à demi vie longue, donc réduisant la persistance virale. Comme ces sous populations sont les actrices principales de la réponse immunitaire adaptative et que leur rôle est crucial dans la pathogenèse de la maladie, les préserver mènera à une meilleure restauration immunitaire.

Enfin, nous sommes convaincus que les résultats générés par notre travail pourraient être considérés dans le cadre de la mise au point des futurs essais thérapeutiques visant un meilleur contrôle de la réplication virale suite à une éventuelle interruption de traitement, voire même l'éradication virale, chez l'enfant infecté par la voie verticale.

Bibliographie

Anderson, J.L. and Hope, T.J., 2003. Recent insights into HIV accessory proteins. *Current Infectious Disease Reports*, 5(5), pp.439-450.

Aquaro, S., Calìo, R., Balzarini, J., Bellocchi, M.C., Garaci, E. and Perno, C.F., 2002. Macrophages and HIV infection: therapeutical approaches toward this strategic virus reservoir. *Antiviral Research*, 55(2), pp.209-225.

Archin, N.M., Vaidya, N.K., Kuruc, J.D., Liberty, A.L., Wiegand, A., Kearney, M.F., Cohen, M.S., Coffin, J.M., Bosch, R.J., Gay, C.L. and Eron, J.J., 2012. Immediate antiviral therapy appears to restrict resting CD4⁺ cell HIV-1 infection without accelerating the decay of latent infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(24), pp.9523-9528.

Arhel, N., 2010. Revisiting HIV-1 uncoating. *Retrovirology*, 7(1), p.96.

Arts, E.J. and Hazuda, D.J., 2012. HIV-1 antiretroviral drug therapy. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2(4), p.a007161.

Ásbjörnsdóttir, K.H., Hughes, J.P., Wamalwa, D., Langat, A., Slyker, J.A., Okinyi, H.M., Overbaugh, J., Benki-Nugent, S., Tapia, K., Maleche-Obimbo, E. and Rowhani-Rahbar, A., 2016. Differences in virologic and immunologic response to antiretroviral therapy among HIV-1 infected infants and children. *AIDS (London, England)*, 30(18), p.2835.

Barré-Sinoussi, F., Chermann, J.C., Rey, F., Nugeyre, M.T., Chamaret, S., Gruest, J., Dauguet, C., Axler-Blin, C., Vézinet-Brun, F., Rouzioux, C. and Rozenbaum, W., 1983. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science*, 220(4599), pp.868-871.

Barré-Sinoussi, F., Ross, A.L. and Delfraissy, J.F., 2013. Past, present and future: 30 years of HIV research. *Nature Reviews Microbiology*, 11(12), p.877.

Baxter, A.E., Niessl, J., Fromentin, R., Richard, J., Porichis, F., Charlebois, R., Massanella, M., Brassard, N., Alshafi, N., Delgado, G.G. and Routy, J.P., 2016. Single-cell characterization of viral translation-competent reservoirs in HIV-infected individuals. *Cell Host & Microbe*, 20(3), pp.368-380.

Baxter, A.E., Niessl, J., Fromentin, R., Richard, J., Porichis, F., Massanella, M., Brassard, N., Alshafi, N., Routy, J.P., Finzi, A. and Chomont, N., 2017. Multiparametric characterization of rare HIV-infected cells using an RNA-flow FISH technique. *Nature Protocols*, 12(10), p.2029.

Beans, E.J., Fournogerakis, D., Gauntlett, C., Heumann, L.V., Kramer, R., Marsden, M.D., Murray, D., Chun, T.W., Zack, J.A. and Wender, P.A., 2013. Highly potent, synthetically accessible prostratin analogs induce latent HIV expression in vitro and ex vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(29), pp.11698-11703.

Berger, E.A., Murphy, P.M. and Farber, J.M., 1999. Chemokine receptors as HIV-1 coreceptors: roles in viral entry, tropism, and disease. *Annual Review of Immunology*, 17(1), pp.657-700.

- Besson, G.J., Lalama, C.M., Bosch, R.J., Gandhi, R.T., Bedison, M.A., Aga, E., Riddler, S.A., McMahon, D.K., Hong, F. and Mellors, J.W., 2014. HIV-1 DNA decay dynamics in blood during more than a decade of suppressive antiretroviral therapy. *Clinical Infectious Diseases*, 59(9), pp.1312-1321.
- Bieniczak, A., Denti, P., Cook, A., Wiesner, L., Mulenga, V., Kityo, C., Kekitiinwa, A., Gibb, D.M., Burger, D., Walker, A.S. and McIlleron, H., 2016. Plasma efavirenz exposure, sex, and age predict virological response in HIV-infected African children. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes (1999)*, 73(2), p.161.
- Bitnun, A., Samson, L., Chun, T.W., Kakkar, F., Brophy, J., Murray, D., Justement, S., Soudeyns, H., Ostrowski, M., Mujib, S. and Harrigan, P.R., 2014. Early Initiation of Combination Antiretroviral Therapy in HIV-1–Infected Newborns Can Achieve Sustained Virologic Suppression With Low Frequency of CD4+ T Cells Carrying HIV in Peripheral Blood. *Clinical Infectious Diseases*, 59(7), pp.1012-1019.
- Bitnun, A., Ransy, D.G., Brophy, J., Kakkar, F., Hawkes, M., Samson, L., Annabi, B., Pagliuzza, A., Morand, J.A., Sauve, L. and Chomont, N., 2019. Clinical Correlates of Human Immunodeficiency Virus–1 (HIV-1) DNA and Inducible HIV-1 RNA Reservoirs in Peripheral Blood in Children With Perinatally Acquired HIV-1 Infection With Sustained Virologic Suppression for at Least 5 Years. *Clinical Infectious Diseases*.
- Blankson, J.N., Persaud, D. and Siliciano, R.F., 2002. The challenge of viral reservoirs in HIV-1 infection. *Annual Review of Medicine*, 53(1), pp.557-593.
- Brenchley, J.M., Schacker, T.W., Ruff, L.E., Price, D.A., Taylor, J.H., Beilman, G.J., Nguyen, P.L., Khoruts, A., Larson, M., Haase, A.T. and Douek, D.C., 2004. CD4+ T cell depletion during all stages of HIV disease occurs predominantly in the gastrointestinal tract. *Journal of Experimental Medicine*, 200(6), pp.749-759.
- Briggs, J.A., Riches, J.D., Glass, B., Bartonova, V., Zanetti, G. and Kräusslich, H.G., 2009. Structure and assembly of immature HIV. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(27), pp.11090-11095.
- Bruner, K.M., Hosmane, N.N. and Siliciano, R.F., 2015. Towards an HIV-1 cure: measuring the latent reservoir. *Trends in Microbiology*, 23(4), pp.192-203.
- Bruner, K.M., Murray, A.J., Pollack, R.A., Soliman, M.G., Laskey, S.B., Capoferri, A.A., Lai, J., Strain, M.C., Lada, S.M., Hoh, R. and Ho, Y.C., 2016. Defective proviruses rapidly accumulate during acute HIV-1 infection. *Nature Medicine*, 22(9), p.1043.
- Budhiraja, S., Famiglietti, M., Bosque, A., Planelles, V. and Rice, A.P., 2013. Cyclin T1 and CDK9 T-loop phosphorylation are downregulated during establishment of HIV-1 latency in primary resting memory CD4+ T cells. *Journal of Virology*, 87(2), pp.1211-1220.
- Bui, J.K., Sobolewski, M.D., Keele, B.F., Spindler, J., Musick, A., Wiegand, A., Luke, B.T., Shao, W., Hughes, S.H., Coffin, J.M. and Kearney, M.F., 2017. Proviruses with identical sequences comprise a large fraction of the replication-competent HIV reservoir. *PLoS Pathogens*, 13(3), p.e1006283.
- Buzon, M.J., Martin-Gayo, E., Pereyra, F., Ouyang, Z., Sun, H., Li, J.Z., Piovoso, M., Shaw, A., Dalmau, J., Zangger, N. and Martinez-Picado, J., 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. *Journal of Virology*, 88(17), pp.10056-10065.
- Cary, D.C., Fujinaga, K. and Peterlin, B.M., 2016. Molecular mechanisms of HIV latency. *The Journal of Clinical Investigation*, 126(2), pp.448-454.
- Chan, M.K., Goodall, R., Judd, A., Klein, N., Chiappini, E., Klimkait, T., Ngo-Giang-Huong, N., Palma, P., Rossi, P., Thorne, C. and Turkova, A., 2019. Predictors of faster virological suppression in early treated infants with perinatal HIV from Europe and Thailand. *AIDS*.
- Chavez, L., Calvanese, V. and Verdin, E., 2015. HIV latency is established directly and early in both resting and activated primary CD4 T cells. *PLoS Pathogens*, 11(6), p.e1004955.
- Chéret, A., Bacchus-Souffan, C., Avettand-Fenoël, V., Mélard, A., Nembot, G., Blanc, C., Samri, A., Sáez-Cirión, A., Hocqueloux, L., Lascoux-Combe, C. and Allavena, C., 2015. Combined ART started during acute HIV infection protects central memory CD4+ T cells and can induce remission. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 70(7), pp.2108-2120.
- Chomont, N., El-Far, M., Ancuta, P., Trautmann, L., Procopio, F.A., Yassine-Diab, B., Boucher, G., Boulassel, M.R., Ghattas, G., Brenchley, J.M. and Schacker, T.W., 2009. HIV reservoir size and persistence are driven by T cell survival and homeostatic proliferation. *Nature Medicine*, 15(8), p.893.
- Chun, T.W., Finzi, D., Margolick, J., Chadwick, K., Schwartz, D. and Siliciano, R.F., 1995. In vivo fate of HIV-1-infected T cells: quantitative analysis of the transition to stable latency. *Nature Medicine*, 1(12), p.1284.
- Chun, T.W., Justement, J.S., Moir, S., Hallahan, C.W., Maenza, J., Mullins, J.I., Collier, A.C., Corey, L. and Fauci, A.S., 2007. Decay of the HIV reservoir in patients receiving antiretroviral therapy for extended periods: implications for eradication of virus. *The Journal of Infectious Diseases*, 195(12), pp.1762-1764.
- Chun, T.W., Nickle, D.C., Justement, J.S., Large, D., Semerjian, A., Curlin, M.E., O'Shea, M.A., Hallahan, C.W., Daucher, M., Ward, D.J. and Moir, S., 2005. HIV-infected individuals receiving effective antiviral therapy for extended periods of time continually replenish their viral reservoir. *The Journal of Clinical Investigation*, 115(11), pp.3250-3255.
- Chun, T.W., Stuyver, L., Mizell, S.B., Ehler, L.A., Mican, J.A.M., Baseler, M., Lloyd, A.L., Nowak, M.A. and Fauci, A.S., 1997. Presence of an inducible HIV-1 latent reservoir during highly active antiretroviral therapy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(24), pp.13193-13197.
- Cillo, A.R., Vagratian, D., Bedison, M.A., Anderson, E.M., Kearney, M.F., Fyne, E., Koontz, D., Coffin, J.M., Piatak, M. and Mellors, J.W., 2014. Improved single-copy assays for quantification of persistent HIV-1 viremia in patients on suppressive antiretroviral therapy. *Journal of Clinical Microbiology*, 52(11), pp.3944-3951.
- Clouse, K.A., Powell, D., Washington, I., Poli, G., Strebel, K., Farrar, W., Barstad, P., Kovacs, J., Fauci, A.S. and Folks, T.M., 1989. Monokine regulation of human immunodeficiency virus-1 expression in a chronically infected human T cell clone. *The Journal of Immunology*, 142(2), pp.431-438.

- Cohen, M.S., Chen, Y.Q., McCauley, M., Gamble, T., Hosseinipour, M.C., Kumarasamy, N., Hakim, J.G., Kumwenda, J., Grinsztejn, B., Pilotto, J.H. and Godbole, S.V., 2016. Antiretroviral therapy for the prevention of HIV-1 transmission. *New England Journal of Medicine*, 375(9), pp.830-839.
- Coiras, M., López-Huertas, M.R., Pérez-Olmeda, M. and Alcamí, J., 2009. Understanding HIV-1 latency provides clues for the eradication of long-term reservoirs. *Nature Reviews Microbiology*, 7(11), p.798.
- Colby, D.J., Trautmann, L., Pinyakorn, S., Leyre, L., Pagliuzza, A., Kroon, E., Rolland, M., Takata, H., Buranapraditkun, S., Intasan, J. and Chomchey, N., 2018. Rapid HIV RNA rebound after antiretroviral treatment interruption in persons durably suppressed in Fiebig I acute HIV infection. *Nature Medicine*, 24(7), p.923.
- Comas-Garcia, M., Davis, S. and Rein, A., 2016. On the selective packaging of genomic RNA by HIV-1. *Viruses*, 8(9), p.246.
- Craigie, R. and Bushman, F.D., 2012. Hiv dna integration. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2(7), p.a006890.
- Crooks, A.M., Bateson, R., Cope, A.B., Dahl, N.P., Griggs, M.K., Kuruc, J.D., Gay, C.L., Eron, J.J., Margolis, D.M., Bosch, R.J. and Archin, N.M., 2015. Precise quantitation of the latent HIV-1 reservoir: implications for eradication strategies. *The Journal of Infectious Diseases*, 212(9), pp.1361-1365.
- Dalglish, A.G., Beverley, P.C., Clapham, P.R., Crawford, D.H., Greaves, M.F. and Weiss, R.A., 1984. The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus. *Nature*, 312(5996), p.763.
- Deeks, S.G., 2012. HIV: Shock and kill. *Nature*, 487(7408), p.439.
- Deeks, S.G., Overbaugh, J., Phillips, A. and Buchbinder, S., 2015. HIV infection. *Nature Reviews Disease Primers*, 1, p.15035.
- Demers, K.R., Makedonas, G., Buggert, M., Eller, M.A., Ratcliffe, S.J., Goonetilleke, N., Li, C.K., Eller, L.A., Rono, K., Maganga, L. and Nitayaphan, S., 2016. Temporal dynamics of CD8+ T cell effector responses during primary HIV infection. *PLoS Pathogens*, 12(8), p.e1005805.
- Descours, B., Cribier, A., Chable-Bessia, C., Ayinde, D., Rice, G., Crow, Y., Yatim, A., Schwartz, O., Laguette, N. and Benkirane, M., 2012. SAMHD1 restricts HIV-1 reverse transcription in quiescent CD4+ T-cells. *Retrovirology*, 9(1), p.87.
- Douek, D.C., Picker, L.J. and Koup, R.A., 2003. T cell dynamics in HIV-1 infection. *Annual Review of Immunology*, 21(1), pp.265-304.
- Dragic, T., Litwin, V., Allaway, G.P., Martin, S.R., Huang, Y., Nagashima, K.A., Cayanan, C., Maddon, P.J., Koup, R.A., Moore, J.P. and Paxton, W.A., 1996. HIV-1 entry into CD4+ cells is mediated by the chemokine receptor CC-CKR-5. *Nature*, 381(6584), p.667.
- Eisele, E. and Siliciano, R.F., 2012. Redefining the viral reservoirs that prevent HIV-1 eradication. *Immunity*, 37(3), pp.377-388.
- Engelman, A. and Cherepanov, P., 2012. The structural biology of HIV-1: mechanistic and therapeutic insights. *Nature Reviews Microbiology*, 10(4), p.279.

- Eriksson, S., Graf, E.H., Dahl, V., Strain, M.C., Yukl, S.A., Lysenko, E.S., Bosch, R.J., Lai, J., Chioma, S., Emad, F. and Abdel-Mohsen, M., 2013. Comparative analysis of measures of viral reservoirs in HIV-1 eradication studies. *PLoS Pathogens*, 9(2), p.e1003174.
- Fanale-Belasio, E., Raimondo, M., Suligoi, B. and Buttò, S., 2010. HIV virology and pathogenetic mechanisms of infection: a brief overview. *Annali dell'Istituto Superiore di Sanita*, 46, pp.5-14.
- Farber, D.L., Yudanin, N.A. and Restifo, N.P., 2014. Human memory T cells: generation, compartmentalization and homeostasis. *Nature Reviews Immunology*, 14(1), p.24.
- Fauci, A.S., 1996. Host factors and the pathogenesis of HIV-induced disease. *Nature*, 384(6609), p.529.
- Feng, Y., Broder, C.C., Kennedy, P.E. and Berger, E.A., 1996. HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor. *Science*, 272(5263), pp.872-877.
- Fernandes, J., Jayaraman, B. and Frankel, A., 2012. The HIV-1 Rev response element: an RNA scaffold that directs the cooperative assembly of a homo-oligomeric ribonucleoprotein complex. *RNA Biology*, 9(1), pp.6-11.
- Finzi, D., Blankson, J., Siliciano, J.D., Margolick, J.B., Chadwick, K., Pierson, T., Smith, K., Lisziewicz, J., Lori, F., Flexner, C. and Quinn, T.C., 1999. Latent infection of CD4+ T cells provides a mechanism for lifelong persistence of HIV-1, even in patients on effective combination therapy. *Nature Medicine*, 5(5), p.512.
- Finzi, D., Hermankova, M., Pierson, T., Carruth, L.M., Buck, C., Chaisson, R.E., Quinn, T.C., Chadwick, K., Margolick, J., Brookmeyer, R. and Gallant, J., 1997. Identification of a reservoir for HIV-1 in patients on highly active antiretroviral therapy. *Science*, 278(5341), pp.1295-1300.
- Folks, T.M., Clouse, K.A., Justement, J., Rabson, A., Duh, E., Kehrl, J.H. and Fauci, A.S., 1989. Tumor necrosis factor alpha induces expression of human immunodeficiency virus in a chronically infected T-cell clone. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 86(7), pp.2365-2368.
- Freed, E.O., 2001. HIV-1 replication. *Somatic Cell and Molecular Genetics*, 26(1-6), pp.13-33.
- Gallo, R.C., Sarin, P.S., Gelmann, E.P., Robert-Guroff, M., Richardson, E., Kalyanaraman, V.S., Mann, D., Sidhu, G.D., Stahl, R.E., Zolla-Pazner, S. and Leibowitch, J., 1983. Isolation of human T-cell leukemia virus in acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science*, 220(4599), pp.865-867.
- Ganesan, A., Chattopadhyay, P.K., Brodie, T.M., Qin, J., Gu, W., Mascola, J.R., Michael, N.L., Follmann, D.A. and Roederer, M., 2010. Immunologic and virologic events in early HIV infection predict subsequent rate of progression.
- Ganser-Pornillos, B.K., Yeager, M. and Sundquist, W.I., 2008. The structural biology of HIV assembly. *Current Opinion in Structural Biology*, 18(2), pp.203-217.
- Gerritsen, M.E., Williams, A.J., Neish, A.S., Moore, S., Shi, Y. and Collins, T., 1997. CREB-binding protein/p300 are transcriptional coactivators of p65. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(7), pp.2927-2932.
- Goetghebuer, T., Le Chenadec, J., Haelterman, E., Galli, L., Dollfus, C., Thorne, C., Judd, A., Keiser, O., Ramos, J.T., Levy, J. and Warszawski, J., 2011. Short-and long-term immunological and virological

outcome in HIV-infected infants according to the age at antiretroviral treatment initiation. *Clinical Infectious Diseases*, 54(6), pp.878-881.

Goulder, P.J., Lewin, S.R. and Leitman, E.M., 2016. Paediatric HIV infection: the potential for cure. *Nature Reviews Immunology*, 16(4), p.259.

Greene, W.C. and Peterlin, B.M., 2002. Charting HIV's remarkable voyage through the cell: Basic science as a passport to future therapy. *Nature Medicine*, 8(7), p.673.

Hammer, S.M., Katzenstein, D.A., Hughes, M.D., Gundacker, H., Schooley, R.T., Haubrich, R.H., Henry, W.K., Lederman, M.M., Phair, J.P., Niu, M. and Hirsch, M.S., 1996. A trial comparing nucleoside monotherapy with combination therapy in HIV-infected adults with CD4 cell counts from 200 to 500 per cubic millimeter. *New England Journal of Medicine*, 335(15), pp.1081-1090.

Hezareh, M., Moukil, M.A., Szanto, I., Pondarzewski, M., Mouche, S., Cherix, N., Brown, S.J., Carpentier, J.L. and Foti, M., 2004. Mechanisms of HIV receptor and co-receptor down-regulation by prostratin: role of conventional and novel PKC isoforms. *Antiviral Chemistry and Chemotherapy*, 15(4), pp.207-222.

Ho, Y.C., Shan, L., Hosmane, N.N., Wang, J., Laskey, S.B., Rosenbloom, D.I., Lai, J., Blankson, J.N., Siliciano, J.D. and Siliciano, R.F., 2013. Replication-competent noninduced proviruses in the latent reservoir increase barrier to HIV-1 cure. *Cell*, 155(3), pp.540-551.

Hocqueloux, L., Avettand-Fenoël, V., Jacquot, S., Prazuck, T., Legac, E., Mélard, A., Niang, M., Mille, C., Le Moal, G., Viard, J.P. and 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. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 68(5), pp.1169-1178.

Hodel, F., Patxot, M., Snäkä, T. and Ciuffi, A., 2016. HIV-1 latent reservoir: size matters. *Future Virology*, 11(12), pp.785-794.

Hosmane, N.N., Kwon, K.J., Bruner, K.M., Capoferri, A.A., Beg, S., Rosenbloom, D.I., Keele, B.F., Ho, Y.C., Siliciano, J.D. and Siliciano, R.F., 2017. Proliferation of latently infected CD4+ T cells carrying replication-competent HIV-1: Potential role in latent reservoir dynamics. *Journal of Experimental Medicine*, 214(4), pp.959-972.

Hu, W.S. and Hughes, S.H., 2012. HIV-1 reverse transcription. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2(10), p.a006882.

Jiamsakul, A., Kariminia, A., Althoff, K.N., Cesar, C., Cortes, C.P., Davies, M.A., Do, V.C., Eley, B., Gill, J., Kumarasamy, N. and Machado, D.M., 2017. HIV viral load suppression in adults and children receiving antiretroviral therapy—results from the IeDEA collaboration. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes (1999)*, 76(3), p.319.

Kaech, S.M., Wherry, E.J. and Ahmed, R., 2002. Vaccines: effector and memory T-cell differentiation: implications for vaccine development. *Nature Reviews Immunology*, 2(4), p.251.

Kao, S.Y., Calman, A.F., Luciw, P.A. and Peterlin, B.M., 1987. Anti-termination of transcription within the long terminal repeat of HIV-1 by tat gene product. *Nature*, 330(6147), p.489.

Karn, J., 2011. The molecular biology of HIV latency: breaking and restoring the Tat-dependent transcriptional circuit. *Current Opinion in HIV and AIDS*, 6(1), p.4.

Kauder, S.E., Bosque, A., Lindqvist, A., Planelles, V. and Verdin, E., 2009. Epigenetic regulation of HIV-1 latency by cytosine methylation. *PLoS Pathogens*, 5(6), p.e1000495.

Kazanietz, M.G., Areces, L.B., Bahador, A.F.S.H.I.N., Mischak, H.A.R.A.L.D., Goodnight, J.O.A.N.N.E., Mushinski, J.F. and Blumberg, P.M., 1993. Characterization of ligand and substrate specificity for the calcium-dependent and calcium-independent protein kinase C isozymes. *Molecular Pharmacology*, 44(2), pp.298-307.

Kiselinova, M., De Spiegelaere, W., Buzon, M.J., Malatinkova, E., Lichterfeld, M. and Vandekerckhove, L., 2016. Integrated and total HIV-1 DNA predict ex vivo viral outgrowth. *PLoS pathogens*, 12(3), p.e1005472.

Klatzmann, D., Champagne, E., Chamaret, S., Gruest, J., Guetard, D., Hercend, T., Gluckman, J., and Montagnier, L. (1984). T-lymphocyte T4 molecule behaves as the receptor for human retrovirus LAV. *Nature* 312, 767-768

Korin, Y.D., Brooks, D.G., Brown, S., Korotzer, A. and Zack, J.A., 2002. Effects of prostratin on T-cell activation and human immunodeficiency virus latency. *Journal of Virology*, 76(16), pp.8118-8123.

Kuhn, L., Paximadis, M., Dias, B.D.C., Loubser, S., Strehlau, R., Patel, F., Shiau, S., Coovadia, A., Abrams, E.J. and Tiemessen, C.T., 2018. Age at antiretroviral therapy initiation and cell-associated HIV-1 DNA levels in HIV-1-infected children. *PloS One*, 13(4), p.e0195514.

Kulpa, D.A. and Chomont, N., 2015. HIV persistence in the setting of antiretroviral therapy: when, where and how does HIV hide?. *Journal of Virus Eradication*, 1(2), p.59.

Laird, G.M., Eisele, E.E., Rabi, S.A., Lai, J., Chioma, S., Blankson, J.N., Siliciano, J.D. and Siliciano, R.F., 2013. Rapid quantification of the latent reservoir for HIV-1 using a viral outgrowth assay. *PLoS Pathogens*, 9(5), p.e1003398.

Lenasi, T., Contreras, X. and Peterlin, B.M., 2008. Transcriptional interference antagonizes proviral gene expression to promote HIV latency. *Cell Host & Microbe*, 4(2), pp.123-133.

Lewis, J., Payne, H., Walker, A.S., Otworld, K., Gibb, D.M., Babiker, A.G., Panchia, R., Cotton, M.F., Violari, A., Klein, N. and Callard, R.E., 2017. Thymic output and CD4 T-cell reconstitution in HIV-infected children on early and interrupted antiretroviral treatment: evidence from the Children With HIV Early Antiretroviral Therapy trial. *Frontiers in Immunology*, 8, p.1162.

Li, J.Z., Etemad, B., Ahmed, H., Aga, E., Bosch, R.J., Mellors, J.W., Kuritzkes, D.R., Lederman, M.M., Para, M. and Gandhi, R.T., 2016. The size of the expressed HIV reservoir predicts timing of viral rebound after treatment interruption. *AIDS (London, England)*, 30(3), p.343.

Li, Q., Duan, L., Estes, J.D., Ma, Z.M., Rourke, T., Wang, Y., Reilly, C., Carlis, J., Miller, C.J. and Haase, A.T., 2005. Peak SIV replication in resting memory CD4+ T cells depletes gut lamina propria CD4+ T cells. *Nature*, 434(7037), p.1148.

Luzuriaga, K., Gay, H., Ziemniak, C., Sanborn, K.B., Somasundaran, M., Rainwater-Lovett, K., Mellors, J.W., Rosenbloom, D. and Persaud, D., 2015. Viremic relapse after HIV-1 remission in a perinatally infected child. *New England Journal of Medicine*, 372(8), pp.786-788.

Luzuriaga, K., Tabak, B., Garber, M., Chen, Y.H., Ziemniak, C., McManus, M.M., Murray, D., Strain, M.C., Richman, D.D., Chun, T.W. and Cunningham, C.K., 2014. HIV type 1 (HIV-1) Proviral reservoirs

decay continuously under sustained Virologic control in HIV-1–infected children who received early treatment. *The Journal of Infectious Diseases*, 210(10), pp.1529-1538.

Maartens, G., Celum, C. and Lewin, S.R., 2014. HIV infection: epidemiology, pathogenesis, treatment, and prevention. *The Lancet*, 384(9939), pp.258-271.

Mao, Y., Wang, L., Gu, C., Herschhorn, A., Xiang, S.H., Haim, H., Yang, X. and Sodroski, J., 2012. Subunit organization of the membrane-bound HIV-1 envelope glycoprotein trimer. *Nature Structural & Molecular Biology*, 19(9), p.893.

Marin, M., Rose, K.M., Kozak, S.L. and Kabat, D., 2003. HIV-1 Vif protein binds the editing enzyme APOBEC3G and induces its degradation. *Nature Medicine*, 9(11), p.1398.

Martínez-Bonet, M., Puertas, M.C., Fortuny, C., Ouchi, D., Mellado, M.J., Rojo, P., Noguera-Julian, A., Muñoz-Fernández, M.A. and Martínez-Picado, J., 2015. Establishment and replenishment of the viral reservoir in perinatally HIV-1-infected children initiating very early antiretroviral therapy. *Clinical Infectious Diseases*, 61(7), pp.1169-1178.

Mattapallil, J.J., Douek, D.C., Hill, B., Nishimura, Y., Martin, M. and Roederer, M., 2005. Massive infection and loss of memory CD4+ T cells in multiple tissues during acute SIV infection. *Nature*, 434(7037), p.1093.

Mavigner, M., Habib, J., Deleage, C., Rosen, E., Mattingly, C., Bricker, K., Kashuba, A., Amblard, F., Schinazi, R.F., Jean, S. and Cohen, J., 2018. SIV persistence in cellular and anatomic reservoirs in ART-suppressed infant rhesus macaques. *Journal of Virology*, pp.JVI-00562.

Mbonye, U. and Karn, J., 2017. The molecular basis for human immunodeficiency virus latency. *Annual Review of Virology*, 4, pp.261-285.

McManus, M., Mick, E., Hudson, R., Mofenson, L.M., Sullivan, J.L., Somasundaran, M., Luzuriaga, K. and PACTG 356 Investigators, 2016. Early combination antiretroviral therapy limits exposure to HIV-1 replication and cell-associated HIV-1 DNA levels in infants. *PloS One*, 11(4), p.e0154391.

Mellors, J.W., Munoz, A., Giorgi, J.V., Margolick, J.B., Tassoni, C.J., Gupta, P., Kingsley, L.A., Todd, J.A., Saah, A.J., Detels, R. and Phair, J.P., 1997. Plasma viral load and CD4+ lymphocytes as prognostic markers of HIV-1 infection. *Annals of Internal Medicine*, 126(12), pp.946-954.

Molitor, J.A., Walker, W.H., Doerre, S., Ballard, D.W. and Greene, W.C., 1990. NF-kappa B: a family of inducible and differentially expressed enhancer-binding proteins in human T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87(24), pp.10028-10032.

Mujugira, A., Celum, C., Tappero, J.W., Ronald, A., Mugo, N. and Baeten, J.M., 2016. Younger age predicts failure to achieve viral suppression and virologic rebound among HIV-1-infected persons in serodiscordant partnerships. *AIDS Research and Human Retroviruses*, 32(2), pp.148-154.

Natarajan, V., Bosche, M., Metcalf, J.A., Ward, D.J., Lane, H.C. and Kovacs, J.A., 1999. HIV-1 replication in patients with undetectable plasma virus receiving HAART. *The Lancet*, 353(9147), pp.119-120.

Ne, E., Palstra, R.J. and Mahmoudi, T., 2018. Transcription: Insights from the HIV-1 promoter. In *International Review of Cell and Molecular Biology* (Vol. 335, pp. 191-243). Academic Press.

- Newell, M.L., 2001. Prevention of mother-to-child transmission of HIV: challenges for the current decade. *Bulletin of the World Health Organization*, 79, pp.1138-1144.
- Newell, M.L., Coovadia, H., Cortina-Borja, M., Rollins, N., Gaillard, P. and Dabis, F., 2004. Mortality of infected and uninfected infants born to HIV-infected mothers in Africa: a pooled analysis. *The Lancet*, 364(9441), pp.1236-1243.
- O'Doherty, U., Swiggard, W.J., Jeyakumar, D., McGain, D. and Malim, M.H., 2002. A sensitive, quantitative assay for human immunodeficiency virus type 1 integration. *Journal of Virology*, 76(21), pp.10942-10950.
- Okoye, A.A. and Picker, L.J., 2013. CD 4+ T-cell depletion in HIV infection: mechanisms of immunological failure. *Immunological Reviews*, 254(1), pp.54-64.
- Pace, M.J., Graf, E.H. and O'Doherty, U., 2013. HIV 2-long terminal repeat circular DNA is stable in primary CD4+ T Cells. *Virology*, 441(1), pp.18-21.
- Palella Jr, F.J., Delaney, K.M., Moorman, A.C., Loveless, M.O., Fuhrer, J., Satten, G.A., Aschman, D.J., Holmberg, S.D. and HIV Outpatient Study Investigators, 1998. Declining morbidity and mortality among patients with advanced human immunodeficiency virus infection. *New England Journal of Medicine*, 338(13), pp.853-860.
- Palma, P., Foster, C., Rojo, P., Zangari, P., Yates, A., Cotugno, N., Klein, N., Luzuriaga, K., Pahwa, S., Nastouli, E. and Gibb, D.M., 2015. The EPHICAL project: an emerging global collaboration to investigate immunotherapeutic strategies in HIV-infected children. *Journal of Virus Eradication*, 1(3), p.134.
- Palmer, S., Josefsson, L. and Coffin, J.M., 2011. HIV reservoirs and the possibility of a cure for HIV infection. *Journal of Internal Medicine*, 270(6), pp.550-560.
- Palmer, S., Maldarelli, F., Wiegand, A., Bernstein, B., Hanna, G.J., Brun, S.C., Kempf, D.J., Mellors, J.W., Coffin, J.M. and King, M.S., 2008. Low-level viremia persists for at least 7 years in patients on suppressive antiretroviral therapy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(10), pp.3879-3884.
- Palmer, S., Wiegand, A.P., Maldarelli, F., Bazmi, H., Mican, J.M., Polis, M., Dewar, R.L., Planta, A., Liu, S., Metcalf, J.A. and Mellors, J.W., 2003. New real-time reverse transcriptase-initiated PCR assay with single-copy sensitivity for human immunodeficiency virus type 1 RNA in plasma. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(10), pp.4531-4536.
- Perelson, A.S., Essunger, P., Cao, Y., Vesanen, M., Hurley, A., Saksela, K., Markowitz, M. and Ho, D.D., 1997. Decay characteristics of HIV-1-infected compartments during combination therapy. *Nature*, 387(6629), p.188.
- Perelson, A.S., Neumann, A.U., Markowitz, M., Leonard, J.M. and Ho, D.D., 1996. HIV-1 dynamics in vivo: virion clearance rate, infected cell life-span, and viral generation time. *Science*, 271(5255), pp.1582-1586.
- Persaud, D., Gay, H., Ziemniak, C., Chen, Y.H., Piatak Jr, M., Chun, T.W., Strain, M., Richman, D. and Luzuriaga, K., 2013. Absence of detectable HIV-1 viremia after treatment cessation in an infant. *New England Journal of Medicine*, 369(19), pp.1828-1835.

Persaud, D., Palumbo, P.E., Ziemniak, C., Hughes, M.D., Alvero, C.G., Luzuriaga, K., Yogev, R., Capparelli, E.V. and Chadwick, E.G., 2012. Dynamics of the resting CD4+ T-cell latent HIV reservoir in infants initiating HAART less than 6 months of age. *AIDS (London, England)*, 26(12), p.1483.

Persaud, D., Patel, K., Karalius, B., Rainwater-Lovett, K., Ziemniak, C., Ellis, A., Chen, Y.H., Richman, D., Siberry, G.K., Van Dyke, R.B. and Burchett, S., 2014. Influence of age at virologic control on peripheral blood human immunodeficiency virus reservoir size and serostatus in perinatally infected adolescents. *JAMA Pediatrics*, 168(12), pp.1138-1146.

Persaud, D., Zhou, Y., Siliciano, J.M. and Siliciano, R.F., 2003. Latency in human immunodeficiency virus type 1 infection: no easy answers. *Journal of Virology*, 77(3), pp.1659-1665.

Picker, L.J., 2006. Immunopathogenesis of acute AIDS virus infection. *Current Opinion in Immunology*, 18(4), pp.399-405.

Prendergast, A., Mphatswe, W., Tudor-Williams, G., Rakgotho, M., Pillay, V., Thobakgale, C., McCarthy, N., Morris, L., Walker, B.D. and Goulder, P., 2008. Early virological suppression with three-class antiretroviral therapy in HIV-infected African infants. *AIDS*, 22(11), pp.1333-1343.

Procopio, F.A., Fromentin, R., Kulpa, D.A., Brehm, J.H., Bebin, A.G., Strain, M.C., Richman, D.D., O'Doherty, U., Palmer, S., Hecht, F.M. and Hoh, R., 2015. A novel assay to measure the magnitude of the inducible viral reservoir in HIV-infected individuals. *EBioMedicine*, 2(8), pp.874-883.

Reid, M., Ma, Y., Scherzer, R., Price, J.C., French, A.L., Huhn, G.D., Plankey, M.W., Peters, M., Grunfeld, C. and Tien, P.C., 2018. Contribution of liver fibrosis and microbial translocation to immune activation in persons infected with HIV and/or hepatitis C virus. *The Journal of Infectious Diseases*, 217(8), pp.1289-1297.

Richard, J., Prévost, J., Alshafi, N., Ding, S. and Finzi, A., 2018. Impact of HIV-1 envelope conformation on ADCC responses. *Trends in Microbiology*, 26(4), pp.253-265.

Richardson, B.A., Mbori-Ngacha, D., Lavreys, L., John-Stewart, G.C., Nduati, R., Panteleeff, D.D., Emery, S., Kreiss, J.K. and Overbaugh, J., 2003. Comparison of human immunodeficiency virus type 1 viral loads in Kenyan women, men, and infants during primary and early infection. *Journal of Virology*, 77(12), pp.7120-7123.

Riddler, S.A., Aga, E., Bosch, R.J., Bastow, B., Bedison, M., Vagratian, D., Vaida, F., Eron, J.J., Gandhi, R.T., Mellors, J.W. and ACTG A5276s Protocol Team, 2015. Continued Slow Decay of the Residual Plasma Viremia Level in HIV-1-Infected Adults Receiving Long-term Antiretroviral Therapy. *The Journal of Infectious Diseases*, 213(4), pp.556-560.

Rouzioux, C., Mélard, A. and Avéttand-Fénoël, V., 2014. Quantification of total HIV1-DNA in peripheral blood mononuclear cells. In *Human Retroviruses* (pp. 261-270). Humana Press, Totowa, NJ.

Sáez-Cirión, A., Bacchus, C., Hocqueloux, L., Avettand-Fenoel, V., Girault, I., Lecuroux, C., Potard, V., Versmisse, P., Melard, A., Prazuck, T. and Descours, B., 2013. Post-treatment HIV-1 controllers with a long-term virological remission after the interruption of early initiated antiretroviral therapy ANRS VISCONTI Study. *PLoS Pathogens*, 9(3), p.e1003211.

Sallusto, F., Lenig, D., Förster, R., Lipp, M. and Lanzavecchia, A., 1999. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature*, 401(6754), p.708.

- Sanyal, A., Mailliard, R.B., Rinaldo, C.R., Ratner, D., Ding, M., Chen, Y., Zerbato, J.M., Giacobbi, N.S., Venkatachari, N.J., Patterson, B.K. and Chargin, A., 2017. Novel assay reveals a large, inducible, replication-competent HIV-1 reservoir in resting CD4+ T cells. *Nature Medicine*, 23(7), p.885.
- Schröder, A.R., Shinn, P., Chen, H., Berry, C., Ecker, J.R. and Bushman, F., 2002. HIV-1 integration in the human genome favors active genes and local hotspots. *Cell*, 110(4), pp.521-529.
- Sengupta, S. and Siliciano, R.F., 2018. Targeting the latent reservoir for HIV-1. *Immunity*, 48(5), pp.872-895.
- Shearer, W.T., Quinn, T.C., LaRussa, P., Lew, J.F., Mofenson, L., Almy, S., Rich, K., Handelsman, E., Diaz, C., Pagano, M. and Smeriglio, V., 1997. Viral load and disease progression in infants infected with human immunodeficiency virus type 1. *New England Journal of Medicine*, 336(19), pp.1337-1342.
- Shiau, S., Strehlau, R., Technau, K.G., Patel, F., Arpadi, S.M., Coovadia, A., Abrams, E.J. and Kuhn, L., 2017. Early age at start of antiretroviral therapy associated with better virologic control after initial suppression in HIV-infected infants. *AIDS (London, England)*, 31(3), p.355.
- Siliciano, R.F. and Greene, W.C., 2011. HIV latency. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 1(1), p.a007096.
- Sodroski, J., Rosen, C., Wong-Staal, F., Salahuddin, S.Z., Popovic, M., Arya, S., Gallo, R.C. and Haseltine, W.A., 1985. Trans-acting transcriptional regulation of human T-cell leukemia virus type III long terminal repeat. *Science*, 227(4683), pp.171-173.
- Strain, M.C., Lada, S.M., Luong, T., Rought, S.E., Gianella, S., Terry, V.H., Spina, C.A., Woelk, C.H. and Richman, D.D., 2013. Highly precise measurement of HIV DNA by droplet digital PCR. *PloS One*, 8(4), p.e55943.
- Sundquist, W.I. and Kräusslich, H.G., 2012. HIV-1 assembly, budding, and maturation. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2(7), p.a006924.
- Tagarro, A., Chan, M., Zangari, P., Ferns, B., Foster, C., De Rossi, A., Nastouli, E., Muñoz-Fernández, M.A., Gibb, D., Rossi, P. and Giaquinto, C., 2018. Early and highly suppressive antiretroviral therapy are main factors associated with low viral reservoir in european perinatally HIV-infected children. *JAIDS Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*, 79(2), pp.269-276.
- UNAIDS. 2017. Global AIDS Update 2017
- Van Damme, N., Goff, D., Katsura, C., Jorgenson, R.L., Mitchell, R., Johnson, M.C., Stephens, E.B. and Guatelli, J., 2008. The interferon-induced protein BST-2 restricts HIV-1 release and is downregulated from the cell surface by the viral Vpu protein. *Cell Host & Microbe*, 3(4), pp.245-252.
- Van Lint, C., 2000. Role of chromatin in HIV-1 transcriptional regulation. In *Advances in Pharmacology* (Vol. 48, pp. 121-160). Academic Press.
- Van Lint, C., Bouchat, S. and Marcello, A., 2013. HIV-1 transcription and latency: an update. *Retrovirology*, 10(1), p.67.
- Van Lint, C., Emiliani, S., Ott, M. and Verdin, E., 1996. Transcriptional activation and chromatin remodeling of the HIV-1 promoter in response to histone acetylation. *The EMBO Journal*, 15(5), pp.1112-1120.

- Vandergeeten, C., Fromentin, R., Merlini, E., Lawani, M.B., DaFonseca, S., Bakeman, W., McNulty, A., Ramgopal, M., Michael, N., Kim, J.H. and Ananworanich, J., 2014. Cross-clade ultrasensitive PCR-based assays to measure HIV persistence in large-cohort studies. *Journal of Virology*, 88(21), pp.12385-12396.
- Whitney, J.B., Hill, A.L., Sanisetty, S., Penaloza-MacMaster, P., Liu, J., Shetty, M., Parenteau, L., Cabral, C., Shields, J., Blackmore, S. and Smith, J.Y., 2014. Rapid seeding of the viral reservoir prior to SIV viraemia in rhesus monkeys. *Nature*, 512(7512), p.74.
- Wiley, R.L., Maldarelli, F., Martin, M.A. and Strebel, K., 1992. Human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein induces rapid degradation of CD4. *Journal of Virology*, 66(12), pp.7193-7200.
- Williams, S.A., Chen, L.F., Kwon, H., Ruiz-Jarabo, C.M., Verdin, E. and Greene, W.C., 2006. NF- κ B p50 promotes HIV latency through HDAC recruitment and repression of transcriptional initiation. *The EMBO Journal*, 25(1), pp.139-149.
- Wong, J.K., Hezareh, M., Günthard, H.F., Havlir, D.V., Ignacio, C.C., Spina, C.A. and Richman, D.D., 1997. Recovery of replication-competent HIV despite prolonged suppression of plasma viremia. *Science*, 278(5341), pp.1291-1295.
- Yukl, S.A., Kaiser, P., Kim, P., Telwatte, S., Joshi, S.K., Vu, M., Lampiris, H. and Wong, J.K., 2018. HIV latency in isolated patient CD4⁺ T cells may be due to blocks in HIV transcriptional elongation, completion, and splicing. *Science Translational Medicine*, 10(430), p.eaap9927.
- Zerbato, J.M., McMahan, D.K., Sobolewski, M.D., Mellors, J.W. and Sluis-Cremer, N., 2019. Naïve CD4⁺ T Cells Harbor a Large Inducible Reservoir of Latent, Replication-Competent HIV-1. *Clinical Infectious Diseases*.
- Zhu, J., Yamane, H. and Paul, W.E., 2009. Differentiation of effector CD4 T cell populations. *Annual Review of Immunology*, 28, pp.445-489.

ANNEXE: Clinical correlates of HIV-1 DNA and inducible HIV-1 RNA reservoirs in peripheral blood in children with perinatally acquired HIV-1 infection with sustained virologic suppression for at least 5 years.

Accepted on 20 March 2019 and published on 28 March 2019

Ma contribution à ce travail:

Ma tâche consistait à faire les expériences de quantification de l'ADN total dans les PBMC, dans leur ensemble. Pour les tests de stimulation à la prostratine, j'étais en charge de réaliser la première phase du test: depuis la décongélation jusqu'à la récolte du surnageant de stimulation et sa congélation. Ensuite, j'étais en charge de les envoyer au Laboratoire national des services de référence du VIH de l'Agence de la santé publique du Canada pour la quantification de l'ARN viral par droplet digital TM PCR.

1. Ari Bitnun, Department of Pediatrics, Hospital for Sick Children, University of Toronto, Toronto, Ontario, Canada
2. Doris G. Ransy, Centre de recherche du CHU Sainte-Justine, Montreal, Quebec, Canada
3. Jason Brophy, Department of Pediatrics, Children's Hospital of Eastern Ontario, University of Ottawa, Ottawa, Ontario, Canada
4. Fatima Kakkar, Department of Pediatrics, CHU Sainte-Justine, Université de Montréal, Montreal, Quebec, Canada
5. Michael Hawkes, Department of Pediatrics, Stollery Children's Hospital, University of Alberta, Edmonton, Alberta, Canada

6. Lindy Samson, Department of Pediatrics, Children's Hospital of Eastern Ontario, University of Ottawa, Ottawa, Ontario, Canada
7. Bayader Annabi, Centre de recherche du CHU Sainte-Justine, and Department of Microbiology, Infectiology & Immunology, Université de Montréal, Montreal, Quebec, Canada
8. Amélie Pagliuzza, Centre de recherche du Centre hospitalier de l'Université de Montréal, Montreal, Quebec, Canada
9. Jacob-Adams Morand, Centre de recherche du CHU Sainte-Justine, and Department of Microbiology, Infectiology & Immunology, Université de Montréal, Montreal, Quebec, Canada
10. Laura Sauve, Oak Tree Clinic, Women's Hospital and Health Centre of British Columbia, Department of Pediatrics, University of British Columbia, Vancouver, Canada
11. Nicolas Chomont, Centre de recherche du Centre hospitalier de l'Université de Montréal and Department of Microbiology, Infectiology & Immunology, Université de Montréal, Montreal, Quebec, Canada
12. Stephanie Lavoie, National HIV & Retrovirology Laboratories, Public Health Agency of Canada, Winnipeg, Manitoba, Canada
13. John Kim, National HIV & Retrovirology Laboratories, Public Health Agency of Canada, Winnipeg, Manitoba, Canada
14. Paul Sandstrom, National HIV & Retrovirology Laboratories, Public Health Agency of Canada, Ottawa, Ontario, Canada
15. Paul Wender, Department of Chemistry and Department of Chemical and Systems Biology, Stanford University, Stanford, California, United States

16. Terry Lee, CIHR Canadian HIV Trials Network, Vancouver, British Columbia, Canada
17. Joel Singer, CIHR Canadian HIV Trials Network, School of Population and Public Health, University of British Columbia, Vancouver, British Columbia, Canada
18. Stanley E. Read, Department of Pediatrics, Hospital for Sick Children, University of Toronto, Toronto, Ontario, Canada
19. Hugo Soudeyns, Centre de recherche du CHU Sainte-Justine, and Department of Microbiology, Infectiology & Immunology and Department of Pediatrics, Université de Montréal, Montreal, Quebec, Canada.
20. EPIC⁴ Research Group.

Key words: HIV-1 DNA; inducible RNA; child; reservoir; prostratin analogue

Running title: HIV levels low in early treated children

Corresponding author:

Ari Bitnun, MD, MSc, FRCPC

Associate Professor, University of Toronto

Division of Infectious Diseases, the Hospital for Sick Children, Department of Paediatrics

555 University Avenue, Toronto, Ontario, Canada, M5G 1X8

Telephone: 416 813 7654 extension 203362; Fax: 416 813 8404

Email: ari.bitnun@sickkids.ca

FOOTNOTE

EPIC⁴ Research Group is: Ariane Alimenti, BC Women's Hospital & Health Centre, Vancouver; Petronela Ancuta, Centre de recherche du Centre hospitalier de l'Université de Montréal (CHUM), Montreal; Ari Bitnun, Hospital for Sick Children, Department of Pediatrics, University of Toronto, Toronto; Jason Brophy, Children's Hospital of Eastern Ontario, Department of Pediatrics, University of Ottawa, Ottawa; Jared Bullard, Children's Hospital of Winnipeg, University of Manitoba, Winnipeg; Tae-Wook Chun, National Institute of Allergy and Infectious Diseases, Bethesda; Hélène C. F. Côté, University of British Columbia, Vancouver; Joanne Embree, Children's Hospital of Winnipeg, University of Manitoba, Winnipeg; Michael T. Hawkes, Department of Pediatrics, Stollery Children's Hospital, Department of Pediatrics, University of Alberta, Edmonton; Fatima Kakkar, Centre hospitalier universitaire (CHU) Sainte-Justine, Department of Pediatrics, Université de Montréal, Montreal; Christos Karatzios, Montreal Children's Hospital, Department of Pediatrics, McGill University, Montreal; Rupert Kaul, University Health Network, Department of Medicine, University of Toronto, Toronto; John Kim, National HIV and Retrovirology Laboratory (NHRL), Public Health Agency of Canada (PHAC), Winnipeg; Valérie Lamarre, CHU Sainte-Justine, Department of Pediatrics, Université de Montréal, Montreal; Normand Lapointe, CHU Sainte-Justine, Department of Pediatrics, Université de Montréal, Montreal; Pascal Lavoie, BC Women's & Children's Hospital, Vancouver; Terry Lee, CIHR Canadian HIV Trials Network (CTN), Vancouver; Deborah M. Money, BC Women's Hospital & Health Centre, University of British Columbia, Vancouver; Dorothy Moore, Montreal Children's Hospital, Department of pediatrics, McGill University, Montreal; Stanley Read, Hospital for Sick Children, Department of Pediatrics, University of Toronto, Toronto; Robert Reinhard, Public/Global Health Consultant, San Francisco; Lindy

Samson, Children's Hospital of Eastern Ontario, Department of Pediatrics, University of Ottawa, Ottawa; Paul Sandstorm, National HIV and Retrovirology Laboratory (NHRL), Public Health Agency of Canada (PHAC),, Winnipeg; Laura Sauve, BC Women's Hospital & Health Centre, Department of Pediatrics, University of British Columbia, Vancouver; Sandra Seigel, McMaster Children's Hospital, Department of Pediatrics, McMaster University, Hamilton; Joel Singer, CIHR Canadian HIV Trials Network (CTN), Vancouver; Hugo Soudeyns, Centre de recherche du CHU Sainte-Justine, and Department of Microbiology, Infectiology & Immunology and Department of Pediatrics, Université de Montréal, Montreal, Montreal; Ben Tan, Department of Pediatrics, University of Saskatchewan, Saskatoon; Wendy Vaudry, Stollery Children's Hospital, Department of Pediatrics, University of Alberta, Edmonton.

ABSTRACT

Background: The Early Pediatric Initiation Canada Child Cure Cohort (EPIC⁴) study is a prospective, multicenter Canadian cohort study investigating HIV-1 reservoirs, chronic inflammation and immune responses in children with perinatally-acquired HIV-1 infection. The focus of this report is HIV-1 reservoirs and correlates in peripheral blood of children who achieved sustained virologic suppression (SVS) ≥ 5 years.

Methods: HIV-1 reservoirs were determined by measuring HIV-1 DNA in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) and inducible cell-free HIV-1 RNA in CD4⁺ T cells by a prostratin analogue stimulation assay. HIV serology was quantified by signal to cut-off ratio (S/CO).

Results: Of 227 enrolled, 69 had SVS ≥ 5 years. HIV-1 DNA, inducible cell-free HIV-1 RNA and S/CO correlated directly with age of effective cART initiation ($p < 0.001$, $p = 0.036$, $p < 0.001$) and age when SVS was achieved ($p < 0.001$, $p = 0.036$, $p < 0.001$) and inversely with proportion of life on effective cART ($p < 0.001$, $p = 0.009$, $p < 0.001$) and proportion of life with SVS ($p < 0.001$, $p = 0.076$, $p < 0.001$). Inducible cell-free HIV-1 RNA correlated with HIV-1 DNA, most particularly in children with SVS, without virologic blips, achieved with first cART regimen initiated prior to 6 months of age ($\rho = 0.74$, $p = 0.037$) or later ($\rho = 0.87$, $p < 0.001$). S/CO correlated with HIV-1 DNA ($p = 0.003$), but less so with inducible cell-free HIV-1 RNA ($p = 0.09$).

Conclusions: The prostratin analogue stimulation assay, with its lower blood volume requirement, could be a valuable method for evaluating inducible HIV-1 reservoirs in children. Standard commercial HIV serology may be a practical initial indirect measure of reservoir size in peripheral blood of children with perinatally-acquired HIV-1 infection.

INTRODUCTION

Initiation of combination antiretroviral therapy (cART) early in human immunodeficiency virus-1 (HIV-1) infection has been associated with lower HIV-1 reservoirs in peripheral blood in both adults and children (1-8). Furthermore, post-treatment control, whereby HIV-1 viral load (VL) remains undetectable for a prolonged period after cessation of cART, has been observed in up to 15% of adults started on cART during early infection despite unfavorable HLA markers (9-11). While there are no equivalent cohort data for children, several case reports support the possibility of prolonged virologic remission after treatment cessation. In the “Mississippi baby”, cART was started at 30 hours of life, virologic suppression (< 48 copies/mL) confirmed at 29 days of life, and treatment stopped at 18 months of life after which VL remained undetectable for 21.9 months (12, 13). In another case from France, virologic remission lasting more than 12 years was observed after treatment cessation in a child who earlier had received 5.5 to 6.5 years of cART beginning at 3 months of age (14).

Measuring the size of the HIV-1 reservoir in a pediatric population is a challenge because the volume of blood available for sampling is limited. Therefore, HIV-1 DNA, a sensitive and reproducible marker of HIV-1 persistence, is often used (1-8). However, it is well-established that HIV-1 DNA measures largely overestimate the size of the replication competent HIV-1 reservoir, since the majority of HIV-1 genomes are defective (15, 16). More recently, robust correlation, and close approximation, of reservoir size by inducible cell-free HIV-1 RNA in CD4+ T cells and the quantitative viral outgrowth assay (QVOA) was demonstrated (17). We used a novel assay, based on prostratin analog (SUW013) stimulation of CD4+ T cells, to measure the inducible HIV-1 reservoir in CD4+ T cells of children with perinatally-acquired HIV-1 infection (18).

The main objectives of the present study were to investigate cross-sectional correlates of HIV-1 reservoir size in peripheral blood of children with perinatally-acquired HIV-1 infection with sustained virologic suppression (SVS) of at least 5 years duration, and to evaluate the utility of the prostratin analogue stimulation assay (18), as a measure of the reservoir size in children.

METHODS

Study design

The Early Pediatric Initiation Canada Child Cure Cohort (EPIC⁴) study is a prospective, multicenter Canadian cohort study investigating HIV-1 reservoirs, chronic inflammation and immune responses in children with perinatally-acquired HIV-1 infection. Children and young adults were recruited from the 8 major pediatric HIV care centers across the country. The current report is a cross sectional analysis of predictors of HIV-1 reservoir size in peripheral blood in the subset of children who had achieved SVS for at least 5 years. Children who fulfilled this criterion were categorized *a priori* into three groups: Group 1 consisting of those initiated on effective cART during the first 6 months of life and with SVS on their first cART regimen; Group 2, those initiated on effective cART at or after 6 months of life with SVS on their first cART regimen; and Group 3, those who had failed at least one cART regimen, but who achieved SVS on a subsequent regimen. The study was approved by the Research Ethics Boards of all participating institutions. Voluntary informed consent was provided by the participant or their legal guardian as appropriate.

Definitions

SVS was defined as continuous VL measurements below the level of detection (target not detected, <20, <40 <50 HIV-1 RNA copies/mL plasma, by different assays over time and at different centers), allowing for virologic blips. Effective cART was defined as cART that led to SVS. A virologic blip was defined as a detectable VL < 500 HIV-1 RNA copies/mL of plasma if the VL measurements immediately preceding and following the blip were below the limit of detection. As previously described, the proportion of life on effective cART refers to the sum of all time periods during which the patient received effective cART associated with SVS in days (numerator) divided by patient age in days (denominator) (19). The proportion of life with SVS was defined as the sum

of all time periods during which SVS was achieved in days (numerator) divided by patient age in days (denominator).

Laboratory methods

Total HIV-1 DNA was quantified as previously described (20, 21). Briefly, total PBMCs were digested with proteinase K. Then, a first round of PCR pre-amplification was performed directly on cell lysates using LTR-gag amplification. A nested real-time PCR was then carried out on a Rotor-Gene Q instrument (Qiagen, Mississauga, Canada) using TaqMan probes. The number of copies of the CD3 gene was determined to accurately quantify the number of cells in each reaction. Results were expressed as HIV-1 DNA copies per 10^6 PBMCs.

The level of inducible cell-free HIV-1 RNA in CD4⁺ T cells was measured using the prostratin analogue stimulation assay (18). Briefly, CD4⁺ T cells were negatively purified from PBMCs using the EasySep Human CD4⁺ T Cell Isolation Kit (STEMCELL Technologies, Vancouver, Canada) and resuspended (10^7 cells/mL) in RPMI supplemented with 10% FBS, 1000 UI/mL IL-2, and 50 nM of the SUW013 prostratin analogue (compound 11c in reference 18)(18). After 48h of incubation at 37°C, viral RNA were measured in supernatants using the droplet digital PCR method (ddPCR, see below) (22). Results of the prostratin analogue stimulation assay were expressed as number of copies of HIV-1 RNA produced by 10^6 CD4⁺ T cells.

Ultrasensitive VL testing was performed on plasma samples using the ddPCR method. Briefly, HIV-1 RNA was extracted from 1000 µl of plasma sample, or from 1000 µl of supernatant from prostratin analogue stimulation, with the Nuclisens easyMAG (BioMerieux, Marcy-l'Étoile, France). First strand cDNA synthesis was performed using SuperScript™ VILO™ Master Mix (ThermoFisher Scientific, Waltham, USA). One-step droplet digital PCR reaction mixtures were

done in triplicates for negative and positive controls, while tested samples were amplified across six reactions. Droplets were generated from the PCR reaction mixtures in DG32™ Automated Droplet Generator Cartridges using the Automated Droplet Generator (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA) according to the manufacturer's instructions. PCR was performed using a C1000 Touch™ Thermal Cycler (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA). Fluorescence intensities of each droplet from the samples were measured using the QX200™ Droplet Reader (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA) and analysed in the QuantaSoft™ software.

HIV serology was performed using the Architect HIV-1/2 Ag/Ab Combo Test (Abbott Diagnostics, Mississauga, Canada). The strength of the serologic response was quantified as signal-to-cutoff value [S/CO] of the assay.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using SAS statistical software, version 9.4 (SAS Institute Inc., Cary, NC). Demographic characteristics were summarized using proportions for categorical variables and medians with interquartile ranges (IQR) for continuous variables. Comparison between groups was done using the chi-square test, Fisher's exact test or Wilcoxon rank sum test as appropriate. Correlation was assessed using the Spearman's rank correlation coefficient (ρ).

RESULTS

Of 227 children and young adults with perinatally-acquired HIV-1 infection enrolled in EPIC⁴, 69 (30.4%) had SVS for at least 5 years. This subgroup of children had a median current age of 15.5 years (IQR 12.9, 17.6), median age of effective cART initiation of 3.7 years (IQR 1.5, 8.0) and median duration of SVS of 9.1 years (IQR 6.9, 12.5). Baseline characteristics of the participants according to group are described in Table 1. Group 1 individuals were younger and more likely to be female and to be Canadian born, and tended to have less advanced HIV-1 disease, as defined by less severe worst CDC clinical category, less severe worst CDC immunologic category and higher CD4% nadir, and to have had fewer virologic blips. As would be expected by the nature of the group definitions, the early treated group was significantly more likely to have achieved SVS at a younger age and exhibited a higher proportion of life on effective cART and higher proportion of life with SVS.

HIV-1 reservoir size, as measured by HIV-1 DNA in PBMC, was significantly lower in Group 1 compared to Groups 2 and 3 (Figure 1a and Table 2). A similar, but non-significant trend was observed when the size of the inducible HIV-1 reservoir in CD4+ T cells was estimated using the prostratin analogue stimulation assay (Figure 1b and Table 2). A higher proportion of children in Group 1 had no detectable HIV-1 DNA in PBMC (< 1 copy per 10⁶ PBMC) compared to Group 2 or 3 (70% vs. 13.3% vs. 14.3%, respectively; $p < 0.001$). In a separate analysis of the cohort as a whole, those who had no detectable HIV-1 DNA in PBMC were shown to have achieved SVS at a significantly younger age than those with detectable HIV-1 DNA in PBMC (1.4 years [0.5, 3.5] versus 5.9 years [3.5, 8.9], $p < 0.001$). Inducible cell-free HIV-1 RNA was detected in similar proportions from all three groups (80% Group 1, 86.7% Group 2, 86.2% Group 3), but there was a significant association between absence of inducible cell-free HIV-1 RNA and younger age at

SVS in the full cohort (1.9 years [1.2, 3.9] with no inducible cell-free HIV-1 RNA versus 5.5 years [2.8, 8.8] with inducible cell-free HIV-1 RNA, $p = 0.03$).

Levels of HIV-1 DNA in PBMC correlated directly with age of initiation of effective cART ($\rho = 0.51$, $p < 0.001$) and age when SVS was achieved ($\rho = 0.45$, $p < 0.001$) and inversely with proportion of life on effective cART ($\rho = -0.51$, $p < 0.001$) and proportion of life with SVS ($\rho = -0.42$, $p < 0.001$) (Table 3). Similar, though less robust correlations, were noted for inducible cell-free HIV-1 RNA level in peripheral blood CD4+ T-cells. In an analysis restricted to children with no virologic blips ($n=40$), significant correlation of similar magnitude was retained for all four variables in relation to HIV-1 DNA in PBMC ($\rho = 0.48$, $p = 0.002$; $\rho = 0.49$, $p = 0.002$; $\rho = -0.41$, $p = 0.01$; $\rho = -0.53$, $p < 0.001$, respectively); only proportion of life on effective cART retained significance for inducible cell-free HIV-1 RNA ($\rho=-0.35$, $p = 0.03$).

Quantitative HIV-1 serology, as measured by S/CO, was significantly lower for children in Group 1 compared to that in Groups 2 or 3 (Figure 1c and Table 2). Furthermore, all three children with negative HIV-1 serology were from Group 1, two having been initiated on effective cART within 48 hours of birth and one at 1.7 months of life. As was the case for HIV-1 DNA in PBMC and inducible cell-free HIV-1 RNA level in CD4+ T cells, quantitative HIV-1 serology correlated directly with age of initiation of effective cART and age when SVS was achieved and inversely with proportion of life on effective cART and proportion of life with SVS (Table 3). In addition, total duration of SVS and current CD4 count correlated inversely with quantitative serology. Quantitative HIV-1 serology correlated directly with HIV-1 DNA in PBMC, but less so with inducible cell-free HIV-1 RNA level (Table 3).

A positive correlation was noted between HIV-1 DNA in PBMC and inducible cell-free HIV-1 RNA level in peripheral blood CD4+ T cells ($\rho = 0.50$, $p < 0.001$; Figure 2). This correlation

was particularly robust for children in Groups 1 and 2 who had not had any blips subsequent to achieving SVS ($\rho = 0.74$, $p = 0.037$ for Group 1 [$n=8$]; $\rho = 0.87$, $p < 0.001$ for Group 2 [$n=13$]). There was no significant correlation between HIV-1 DNA in PBMC and inducible cell-free HIV-1 RNA level in peripheral blood CD4⁺ T cells in Group 3 patients ($\rho = 0.34$, $p = 0.17$).

DISCUSSION

This study shows direct correlation of reservoir size in peripheral blood, as measured by both HIV-1 DNA in PBMC and inducible cell-free HIV-1 RNA in CD4+ T cells, with both age at initiation of effective cART and age at which SVS was achieved (3, 5, 7). In addition, as recently reported from the EPIICAL Consortium, we observed a strong inverse correlation between the size of the viral reservoir measured with both assays and the proportion of life on effective cART or proportion of life with SVS (23). Taken together, these findings indicate that smaller reservoir size in peripheral blood is a function of earlier treatment initiation as well as higher proportion of life on effective treatment and with virologic suppression. The findings of this study extend those of other pediatric studies demonstrating lower reservoir size in peripheral blood following early initiation of effective cART (3-8).

Most pediatric studies have relied on measurement of HIV-1 DNA in PBMC to assess reservoir size (3-8). While this methodology has the advantages of being easier to perform and requiring smaller blood volume, it cannot distinguish replication competent virus, as measured by the quantitative viral outgrowth assay (QVOA), from defective virus and tends to over-estimate the size of the replication competent reservoir by as much as 100 fold (15, 16, 24). Poor correlation between the quantitative viral outgrowth assay (QVOA) and HIV-1 DNA measurement has been observed in some (15), but not all studies (25). In this study we demonstrate for the first time that the size of the inducible HIV-1 reservoir in peripheral blood CD4+ T cells of children, as measured by the prostratin analogue stimulation assay, correlates with that measured by HIV-1 DNA. Our results further show that this correlation is most robust among very early treated children with SVS without virologic blips who have very low levels of virus in peripheral blood. The strong correlation between the two assays in this subgroup may reflect a circumstance where less

cumulative viral replication has taken place, thereby limiting both the reservoir size as well as accumulation of defective genomes. This suggests that in very early treated children, virologic blips may be associated with sustained low level viral replication with gradual increase in the proportion of defective genomes.

Previous studies have demonstrated that HIV-1 serology can be negative in perinatally infected children with SVS after initiating cART during the first 3-6 months of life (3, 8, 26). In the present study we demonstrate that standard commercial HIV serology measuring total antibody to gp41, p24 and gp120, quantified by S/CO, correlates with HIV-1 reservoir size in peripheral blood. This contrasts with findings in a cohort of 97 children with perinatally-acquired HIV-1 infection in Mali where anti-gp41 antibody activity, quantified by S/CO, did not correlate with HIV-1 DNA level in PBMC, despite a significant correlation with age of cART initiation (27). A more recent publication demonstrated significant association of anti-gp160 and anti-gp41 antibody levels with HIV-1 DNA level in PBMCs (28). In an analysis of 69 children from the EPIICAL cohort, a Western blot band intensity score correlated directly with time of cART initiation ($p < 0.001$) and with HIV-1 DNA ($p = 0.032$) (29). In our study, antibody levels correlated more robustly with HIV-1 DNA levels than with inducible virus levels. Our data suggest that the Architect HIV-1/2 Ag/Ab Combo Assay could be used as a relatively accessible and inexpensive first step measure of reservoir size in peripheral blood of children with perinatally-acquired HIV-1 infection.

A limitation of this study was its cross-sectional design, though this was mitigated by the high recruitment rate of subjects with SVS from all participating centers and hence the good sample size. The limited volume of blood that could be drawn from younger children precluded quantification of very low levels of virus in peripheral blood (< 10 copies/ 10^6 PBMC for HIV-1 DNA; < 1 copy/ 10^6 CD4+ T cells for inducible virus) or evaluation for replication competent virus

using the quantitative viral outgrowth assay (QVOA), which is considered the current gold standard in terms of reservoir measurement. However, the prostratin analogue stimulation assay correlated well with HIV-1 DNA levels and could represent a useful and cost-effective tool for assessment of the inducible HIV-1 reservoir in peripheral blood of children.

In conclusion, we have demonstrated that the size of the HIV-1 reservoir in peripheral blood correlates directly with age of effective cART initiation and age of SVS and inversely with the proportion of life on effective cART and proportion of life with SVS. We have also shown that the size of the inducible HIV-1 reservoir in peripheral blood CD4⁺ T cells can be estimated in children using the prostratin analogue stimulation assay and that the results of this assay correlate well with HIV-1 DNA levels, particularly in very early treated children with SVS and no virologic blips. As such, the prostratin analogue stimulation assay, with its lower blood volume requirement, may become a valuable method for estimating replication competent HIV-1 reservoirs in children. Finally, we demonstrated that quantified HIV-1 serologic response, using a standard, commercially available HIV-1 serologic assay, may serve as a practical initial indirect measure of reservoir size in the peripheral blood of children with perinatally-acquired HIV-1 infection.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors wish to thank all study participants as well as the following individuals for expert and technical assistance: Cheryl Arneson, Christine Bon, Lise Bourrier, Jennifer Bowes, Martine Caty, Cathy den Hollander, Chantal Dessureault, Jodi Gallant, Shanlea Gordon, Hanh Dao, Evelyn Marquis, Zoe Hassall, Audrée Janelle-Montcalm, Danny Dong Hyun Kim, Nicole Kimball, Matthew Kocal, Ye-Von Lee, Evelyn Mann, Dorothy McKelvey, Karen Mochoruk, Mbaye Ndiaye, Barb Neufeld, Laura Puri, Annie Qiu, Suzanne Taillefer, Silvie Valois. We also would like to acknowledge Dr Carole Lavigne and Ms. Xuefen Yang who contributed to the validation of some of the technical methods in the early phase of this study.

Supported by grant no. HIG-133051 from the Canadian Institutes of health research (CIHR), the Canadian Foundation for AIDS Research (CANFAR), and the International AIDS Society (IAS), and by an infrastructure grant from Réseau SIDA-MI of the Fonds de la recherche du Québec-Santé (FRQS). FK is a Junior 1 Fellow of FRQS. Dr. Paul A Wender is supported by the National Institutes of Health, grant R01 CA031845.

Figure 1:

Impact of age of initiation of effective cART on the size of the viral reservoir, measured by quantitative assay of HIV-1 DNA in PBMC (a), by copies of HIV-1 RNA produced by prostratin analogue stimulated CD4+ T cells (b), and by quantitative HIV-1-specific serologic response (c) in children with perinatally-acquired HIV-1 infection. Horizontal lines correspond to the median and IQR.

Figure 2:

Correlation of HIV-1 reservoir size in PBMC measured using the HIV-1 DNA assay and cell-free HIV-1 RNA in CD4+ T cells using the prostratin analogue stimulation assay.

REFERENCES

1. Jain V, Hartogensis W, Bacchetti P, Hunt PW, Hatano H, Sinclair E, et al. Antiretroviral therapy initiated within 6 months of HIV infection is associated with lower T-cell activation and smaller HIV reservoir size. *The Journal of infectious diseases*. 2013 Oct 15;208(8):1202-11. PubMed PMID: 23852127. Pubmed Central PMCID: 3778965.
2. Laanani M, Ghosn J, Essat A, Melard A, Seng R, Gousset M, et al. Impact of the Timing of Initiation of Antiretroviral Therapy During Primary HIV-1 Infection on the Decay of Cell-Associated HIV-DNA. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2015 Jun 1;60(11):1715-21. PubMed PMID: 25737374.
3. Persaud D, Patel K, Karalius B, Rainwater-Lovett K, Ziemniak C, Ellis A, et al. Influence of age at virologic control on peripheral blood human immunodeficiency virus reservoir size and serostatus in perinatally infected adolescents. *JAMA pediatrics*. 2014 Dec;168(12):1138-46. PubMed PMID: 25286283. Pubmed Central PMCID: 4324476.
4. Foster C, Pace M, Kaye S, Hopkins E, Jones M, Robinson N, et al. Early antiretroviral therapy reduces HIV DNA following perinatal HIV infection. *AIDS*. 2017 Aug 24;31(13):1847-51. PubMed PMID: 28609403.
5. Martinez-Bonet M, Puertas MC, Fortuny C, Ouchi D, Mellado MJ, Rojo P, et al. Establishment and Replenishment of the Viral Reservoir in Perinatally HIV-1-infected Children Initiating Very Early Antiretroviral Therapy. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2015 Oct 1;61(7):1169-78. PubMed PMID: 26063721. Pubmed Central PMCID: 4560905.

6. Tagarro A, Chan M, Zangari P, Ferns B, Foster C, De Rossi A, et al. Early and Highly Suppressive Antiretroviral Therapy Are Main Factors Associated With Low Viral Reservoir in European Perinatally HIV-Infected Children. *Journal of acquired immune deficiency syndromes*. 2018 Oct 1;79(2):269-76. PubMed PMID: 30211778. Pubmed Central PMCID: 6173292.
7. Kuhn L, Paximadis M, Da Costa Dias B, Loubser S, Strehlau R, Patel F, et al. Age at antiretroviral therapy initiation and cell-associated HIV-1 DNA levels in HIV-1-infected children. *PloS one*. 2018;13(4):e0195514. PubMed PMID: 29649264. Pubmed Central PMCID: 5896970.
8. Ananworanich J, Puthanakit T, Suntarattiwong P, Chokephaibulkit K, Kerr SJ, Fromentin R, et al. Reduced markers of HIV persistence and restricted HIV-specific immune responses after early antiretroviral therapy in children. *AIDS*. 2014 Apr 24;28(7):1015-20. PubMed PMID: 24384692.
9. Namazi G, Fajnzylber JM, Aga E, Bosch R, Acosta EP, Sharaf R, et al. The Control of HIV after Antiretroviral Medication Pause (CHAMP) study: post-treatment controllers identified from 14 clinical studies. *The Journal of infectious diseases*. 2018 Aug 6. PubMed PMID: 30085241.
10. Martin GE, Frater J. Post-treatment and spontaneous HIV control. *Current opinion in HIV and AIDS*. 2018 Sep;13(5):402-7. PubMed PMID: 29878914.
11. Saez-Cirion A, Bacchus C, Hocqueloux L, Avettand-Fenoel V, Girault I, Lecuroux C, et al. Post-treatment HIV-1 controllers with a long-term virological remission after the interruption of early initiated antiretroviral therapy ANRS VISCONTI Study. *PLoS*

- pathogens. 2013 Mar;9(3):e1003211. PubMed PMID: 23516360. Pubmed Central PMCID: 3597518. Epub 2013/03/22. eng.
12. Persaud D, Gay H, Ziemniak C, Chen YH, Piatak M, Jr., Chun TW, et al. Absence of detectable HIV-1 viremia after treatment cessation in an infant. *The New England journal of medicine*. 2013 Nov 7;369(19):1828-35. PubMed PMID: 24152233. Epub 2013/10/25. eng.
 13. Luzuriaga K, Gay H, Ziemniak C, Sanborn KB, Somasundaran M, Rainwater-Lovett K, et al. Viremic relapse after HIV-1 remission in a perinatally infected child. *The New England journal of medicine*. 2015 Feb 19;372(8):786-8. PubMed PMID: 25693029. Pubmed Central PMCID: 4440331.
 14. Frange P, Faye A, Avettand-Fenoel V, Bellaton E, Descamps D, Angin M, et al. 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. *The lancet HIV*. 2016 Jan;3(1):e49-54. PubMed PMID: 26762993.
 15. Eriksson S, Graf EH, Dahl V, Strain MC, Yukl SA, Lysenko ES, et al. Comparative analysis of measures of viral reservoirs in HIV-1 eradication studies. *PLoS pathogens*. 2013 Feb;9(2):e1003174. PubMed PMID: 23459007. Pubmed Central PMCID: 3573107.
 16. Ho YC, Shan L, Hosmane NN, Wang J, Laskey SB, Rosenbloom DI, et al. Replication-competent noninduced proviruses in the latent reservoir increase barrier to HIV-1 cure. *Cell*. 2013 Oct 24;155(3):540-51. PubMed PMID: 24243014. Pubmed Central PMCID: 3896327.

17. Massanella M, Yek C, Lada SM, Nakazawa M, Shefa N, Huang K, et al. Improved assays to measure and characterize the inducible HIV reservoir. *EBioMedicine*. 2018 Oct;36:113-21. PubMed PMID: 30316868. Pubmed Central PMCID: 6197429.
18. Beans EJ, Fournogerakis D, Gauntlett C, Heumann LV, Kramer R, Marsden MD, et al. Highly potent, synthetically accessible prostratin analogs induce latent HIV expression in vitro and ex vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2013 Jul 16;110(29):11698-703. PubMed PMID: 23812750. Pubmed Central PMCID: 3718093.
19. Gulhati V, Soo J, Ransey DG, Brophy J, Kakkar F, Bitnun A, et al. Higher levels of Angiopoietin-1 are associated with early and sustained viral suppression in children living with vertically acquired HIV. *J AIDS*. 2018 (submitted).
20. Chomont N, El-Far M, Ancuta P, Trautmann L, Procopio FA, Yassine-Diab B, et al. HIV reservoir size and persistence are driven by T cell survival and homeostatic proliferation. *Nature medicine*. 2009 Aug;15(8):893-900. PubMed PMID: 19543283. Pubmed Central PMCID: 2859814.
21. Vandergeeten C, Fromentin R, Merlini E, Lawani MB, DaFonseca S, Bakeman W, et al. Cross-clade ultrasensitive PCR-based assays to measure HIV persistence in large-cohort studies. *Journal of virology*. 2014 Nov;88(21):12385-96. PubMed PMID: 25122785. Pubmed Central PMCID: 4248919.
22. Strain MC, Lada SM, Luong T, Rought SE, Gianella S, Terry VH, et al. Highly precise measurement of HIV DNA by droplet digital PCR. *PloS one*. 2013;8(4):e55943. PubMed PMID: 23573183. Pubmed Central PMCID: 3616050.

23. Tagarro A, Chan M, Zangari P, Ferns B, Foster C, De Rossi A, et al. Early and Highly Suppressive ART are Main Factors Associated with Low Viral Reservoir in European Perinatally HIV Infected Children. *Journal of acquired immune deficiency syndromes*. 2018 Jun 26. PubMed PMID: 29957674.
24. Bruner KM, Hosmane NN, Siliciano RF. Towards an HIV-1 cure: measuring the latent reservoir. *Trends in microbiology*. 2015 Apr;23(4):192-203. PubMed PMID: 25747663. Pubmed Central PMCID: 4386620.
25. Kiselinova M, De Spiegelaere W, Buzon MJ, Malatinkova E, Lichterfeld M, Vandekerckhove L. Integrated and Total HIV-1 DNA Predict Ex Vivo Viral Outgrowth. *PLoS pathogens*. 2016 Mar;12(3):e1005472. PubMed PMID: 26938995. Pubmed Central PMCID: 4777389.
26. Bitnun A, Samson L, Chun TW, Kakkar F, Brophy J, Murray D, et al. Early initiation of combination antiretroviral therapy in HIV-1-infected newborns can achieve sustained virologic suppression with low frequency of CD4+ T cells carrying HIV in peripheral blood. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2014 Oct;59(7):1012-9. PubMed PMID: 24917662. Pubmed Central PMCID: 4184383.
27. Brice J, Sylla M, Sayon S, Telly F, Bocar-Fofana D, Murphy R, et al. Qualitative and quantitative HIV antibodies and viral reservoir size characterization in vertically infected children with virological suppression. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2017 Apr 1;72(4):1147-51. PubMed PMID: 28039275.
28. McManus M, Henderson J, Gautam A, Brody R, Weiss ER, Persaud D, et al. Quantative HIV-1 antibodies correlate with plasma HIV-1 RNA and cell-associated laves in children

on ART. *Clinical Infectious Diseases*, Published: 05 September 2018, ciy753, <https://doi-orgmyaccesslibraryutorontoca/101093/cid/ciy753>. 2018.

29. Rocca S, Zangari P, Cotugno N, De Rossi A, Ferns B, Petricone D, et al. Human Immunodeficiency Virus (HIV)-Antibody Repertoire Estimates Reservoir Size and Time of Antiretroviral Therapy Initiation in Virally Suppressed Perinatally HIV-Infected Children. *Journal of the Pediatric Infectious Diseases Society*. 2018 Aug 28. PubMed PMID: 30169837.

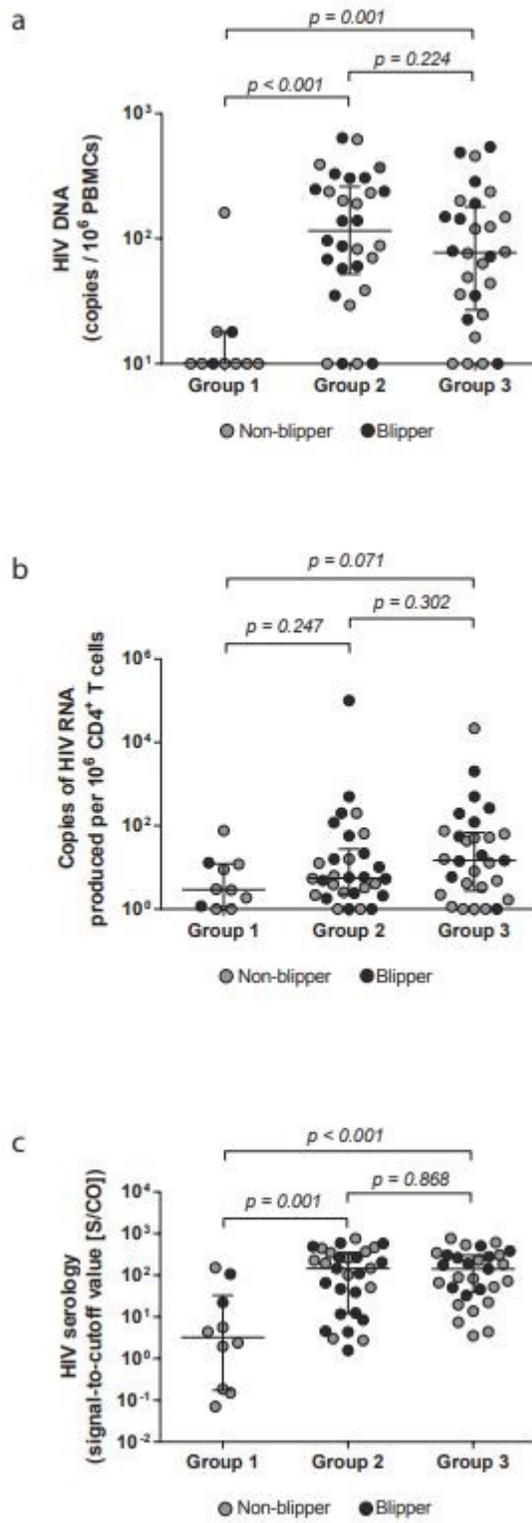


Figure 1

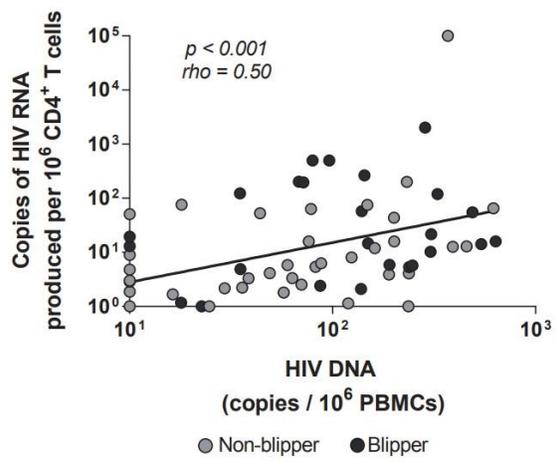


Figure 2

Table 1. Baseline Characteristics According to Age of Effective Combination Antiretroviral Therapy Initiation

Parameter	Group 1 (n = 10)	Group 2 (n = 30)	Group 3 (n = 29)	P Value
Current age, in years	10.1 (8.4, 13.2)	15.7 (13.1, 17.6)	17.0 (14.4, 18.1)	<.001
Biological sex, % male	30.0%	50.0%	72.4%	.04
Ethnicity/race50
African/Caribbean/Black	55.6%	62.1%	44.8%	...
White	22.2%	17.2%	13.8%	...
Indigenous	11.1%	6.9%	27.6%	...
Other	11.1%	13.7%	13.7%	...
Canadian born, %	100%	40%	72.4%	.001
CDC clinical category, worst ^a19
None/mild, N/A	71.5%	58.3%	24.0%	...
Moderate, B	14.3%	16.7%	36.0%	...
AIDS defining conditions, C	14.3%	25.0%	40.0%	...
CDC immunological category, worst ^a18
No suppression	57.1%	24.0%	34.6%	...
Moderate suppression	42.9%	48.0%	26.9%	...
Severe suppression	...	28.0%	38.5%	...
Current ART80
NNRTI-based cART	30.0%	48.3%	40.7%	...
PI-based cART	50.0%	34.5%	33.3%	...
INSTI-based cART ^b	20.0%	17.2%	25.9%	...
Current CD4 count, cells/ μ L	841 (533, 1145)	670 (510, 839)	640 (510, 773)	.29
Current CD4%	38.0 (36.0, 42.0)	36.5 (32.0, 41.0)	36.0 (32.0, 40.0)	.55
CD4% nadir	24.5 (18.0, 32.0)	21.5 (12.0, 29.0)	19.0 (12.0, 25.0)	.15
Viral load peak, log	5.02 (4.83, 5.70)	4.95 (4.12, 5.63)	5.67 (4.99, 5.90)	.03
Virologic blips	20.0%	56.7%	34.5%	.07
Age at start of effective cART, years	0.2 (0.1, 0.4)	3.2 (1.5, 5.4)	6.8 (3.2, 8.7)	<.001
Age at SVS, years	0.8 (0.4, 1.4)	4.3 (2.2, 6.4)	8.5 (3.7, 9.5)	<.001
Duration of SVS, years	8.7 (7.2, 10.3)	10.5 (7.5, 13.8)	8.0 (6.3, 10.1)	.04
Proportion of life on effective cART	0.98 (0.95, 0.99)	0.82 (0.62, 0.89)	0.65 (0.53, 0.84)	<.001
Proportion of life with SVS	0.94 (0.83, 0.97)	0.74 (0.53, 0.83)	0.57 (0.47, 0.77)	<.001

Group 1 had effective cART initiated at <6 months of life, with SVS on the first cART regimen; Group 2 had effective cART initiated at \geq 6 months of life with SVS on the initial regimen; Group 3 failed at least 1 cART regimen, but later achieved SVS on another regimen. Results are shown as medians with IQRs for continuous variables and as proportions for categorical variables.

Abbreviations: AIDS, acquired immunodeficiency syndrome; cART, combination antiretroviral therapy; CDC, Centers for Disease Control and Prevention; INSTI, integrase strand transfer inhibitor; IQR, interquartile range; NNRTI, nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor; PI, protease inhibitor; SVS, sustained virologic suppression.

^aThe worst CDC clinical category was unknown for 13 cases and the worst immunologic category was unknown for 11 cases.

^bIncludes children on INSTI + NRTI and INSTI + PI + NRTI

Table 2. Reservoir Size According to Age of Effective Combination Antiretroviral Therapy Initiation

Parameter		Group 1 (n = 10)	Group 2 (n = 30)	Group 3 (n = 29)	<i>P</i> Value ^a
HIV-1 DNA ^b	Median (IQR)	10.0 (10.0, 18.0)	117.2 (57.5, 247.5)	77.3 (29.8, 170.1)	<.001
	% undetectable	70.0%	13.3%	14.3%	<.001
Cell-free HIV-1 RNA ^c	Median (IQR)	0 (1.2, 12.0)	5.5 (2.4, 21.7)	14.7 (3.4, 63.6)	.17
	% undetectable	20.0%	13.3%	13.8%	.81
Ultrasensitive VL ^d	Median (IQR)	0 (0, 0)	0 (0, 0)	0 (0, 0)	.67
	% negative	90.0%	81.5%	79.2%	.91
Quantitative serology (S/CO)	Median (IQR)	4 (0.2, 22.4)	348.6	141.8 (45.9, 303.9)	.002
	% negative	30.0%	0%	0%	.002

Abbreviations: HIV-1, human immunodeficiency virus–1; IQR, interquartile range; PBMC, peripheral blood mononuclear cell; S/CO, signal-to-cutoff ratio; VL, viral load

^aThe unadjusted *P* values are presented. In the regression analysis adjusting for biological sex, CD4% nadir, VL peak, and virologic blips, no significant changes to the results were observed.

Minor adjusted *P* value changes were in the mean log₁₀ HIV-1 DNA (*P* = .001), percent undetectable HIV-1 DNA (*P* = .018), and mean log₁₀ S/CO (*P* < .001).

^bExpressed as copies per 10⁶ PBMC; <10 copies per 10⁶ PBMC are considered undetectable.

^cExpressed as copies of HIV RNA produced per 10⁶ stimulated CD4+ T-cells; <1 copy per 10⁶ CD4+ T-cells is considered undetectable.

^dLevel of detection set at 5 copies/mL

Table 3. Correlates of Human Immunodeficiency Virus–1 (HIV-1) Reservoir Size in Peripheral Blood and Quantitative HIV-1 Serology

Variable	HIV-1 DNA		Cell-free HIV-1 RNA		HIV-1 Serology	
	Rho	<i>P</i> Value	Rho	<i>P</i> Value	Rho	<i>P</i> Value
Age at cART initiation, years	0.52	<.001	0.26	.03	0.63	<.001
Age at SVS, years	0.44	.00	0.25	.03	0.65	<.001
Duration of SVS, years	-0.1	2	-0.0	8	-0.3	.00
Proportion of life on effective cART	2	.35	8	.54	2	8
Proportion of life with SVS	-0.5	<.001	-0.3	.01	-0.6	<.001
HIV serology (S/CO)	1	.00	2	.07	6	<.001
	-0.4	<.001	-0.2	.08	-0.6	<.001
	1	.00	1	.08	8	<.001
	0.34	5	0.21	9

The values shown are adjusted for biological sex. All other variables considered for the adjusted analysis—including country of birth (Canada vs elsewhere), CD4 nadir, peak VL, and virologic blips—were highly correlated with other predictor variables depicted in the table and, therefore, not included in the model. In the univariate analysis, “current CD4 count” was significantly associated with HIV-1 serology (rho = 0.28; *P* = .022); in the adjusted analysis this significance was lost (rho = 0.21; *P* = .088). Abbreviations: cART, combination antiretroviral therapy; HIV-1, human immunodeficiency virus–1; rho, Spearman partial correlation coefficient; S/CO, signal-to-cutoff ratio; SVS, sustained virologic suppression.