

Université de Montréal

**Effet de la production thymique sur l'homéostasie du
réservoir du VIH-1 chez des individus
recevant une trithérapie antirétrovirale**

Par Isabelle Turcotte

Département de Microbiologie, Infectiologie et Immunologie
Faculté de médecine

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

Automne 2020

© Isabelle Turcotte, 2020

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

Ce mémoire intitulé

**Effet de la production thymique sur l'homéostasie du
réservoir du VIH-1 chez des individus
recevant une trithérapie antirétrovirale**

Présenté par

Isabelle Turcotte

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes

Isabelle Boucoiran

Président-rapporteur

Nicolas Chomont

Directeur de recherche

Hélène Decaluwe

Membre du jury

Résumé

La trithérapie antirétrovirale a considérablement augmenté l'espérance de vie des personnes vivant avec le virus de l'immunodéficience humaine (VIH), mais ne permet pas de guérir l'infection. En effet, le virus latent persiste dans des réservoirs, comme les lymphocytes T CD4+, ce qui empêche son élimination complète. Bien que plusieurs études aient montré un lien entre l'âge et la progression de la maladie, la relation entre le vieillissement et la persistance virale demeure peu explorée. Puisqu'il est connu que la diminution de la production thymique avec l'âge a un impact sur l'homéostasie lymphocytaire, nous avons étudié l'association entre le vieillissement, l'activité thymique et les réservoirs du VIH.

Chez les personnes infectées traitées, nos résultats montrent que le réservoir viral inductible est significativement corrélé à l'âge. Cette association est partiellement expliquée par la diminution de la production thymique, causant notamment une réduction de la fréquence des lymphocytes T CD8+. De plus, nous avons observé que les individus ayant des plaques athérosclérotiques, un indicateur sous clinique fortement associée au vieillissement, ont un réservoir viral plus élevé. Finalement, nos résultats montrent que la restauration du thymus par l'administration d'hormone de croissance semble avoir un impact bénéfique sur la taille du réservoir total.

Nos résultats suggèrent que le réservoir évolue différemment en fonction de l'âge et que l'involution du thymus contribue à la persistance du VIH, ce qui ouvre la voie à de nouvelles approches thérapeutiques. Également, ils indiquent que certaines mesures du réservoir viral pourraient contribuer à l'évaluation du risque de développement de plaques d'athérosclérose.

Mots-clés : VIH, réservoirs, persistance, vieillissement, production thymique, homéostasie, maladies cardiovasculaires.

Abstract

Antiretroviral therapy has prolonged the life expectancy of people living with the human immunodeficiency virus (HIV), but does not cure the infection. Indeed, latent virus persists in reservoirs, like CD4+ T cells, which is a major barrier to its complete elimination. It is well established that age has an impact on the clinical progression of the disease. However, the relationship between aging and viral persistence is still unknown. As age-associated reduction of thymic production has important consequences on lymphocyte homeostasis, we studied the association between aging, thymic activity avec HIV reservoirs.

In infected individuals under antiretroviral therapy, we show that the inducible reservoir is significantly correlated with age. This association can be partially linked to the reduction of thymic production with age, causing a decrease in the frequency of CD8+ T cells. Furthermore, we highlight that individuals with atherosclerotic plaques, a sub-clinical factor highly associated with aging, have a bigger HIV reservoir. Finally, we show that restauration of thymic activity induced by the administration of recombinant growth hormone has a modest but significant beneficial effect on the size of total HIV reservoir.

Overall, our results indicate that HIV reservoir evolves differently with age and that thymic involution contributes to viral persistence, which open the way to novel therapeutic approaches. In addition, they suggest that some viral reservoir measures could contribute to the evaluation of the risk of atherosclerotic plaques development.

Key words : HIV, reservoirs, persistence, aging, thymic production, homeostasis, cardiovascular diseases

Table des matières

Résumé	ii
Abstract	iii
Table des matières	iv
Liste des tableaux	vii
Liste des figures.....	viii
Liste des sigles et abréviations	x
Dédicace	xii
Remerciements	xiii
Chapitre 1 : Introduction	1
1.1 Épidémiologie du VIH	1
1.1.1 Un problème à grande échelle	1
1.1.2 Origine et identification du VIH.....	3
1.2 L'infection par le VIH.....	4
1.2.1 Structure et mode de réplication	4
1.2.2 Pathogénicité.....	7
1.2.3 Limiter la progression de l'infection : la thérapie antirétrovirale	10
1.3 Les réservoirs du VIH.....	12
1.3.1 Le VIH persiste malgré la TAR.....	12
1.3.2 Mécanismes de la persistance virale.....	13
1.3.3 Réservoir viral et génomes défectifs.....	16
1.3.4 Mesurer le réservoir viral.....	17
1.3.5 Cibler le réservoir viral	20
1.4. Vieillir avec le VIH.....	23
1.4.1 L'inflammation chronique	23
1.4.2 Involution thymique et homéostasie lymphocytaire dans un contexte de VIH	25
1.4.3 Maladies cardiovasculaires et infection par le VIH.....	28
1.5 Hypothèses du projet.....	30
Chapitre 2 : Matériel et méthode	32
2.1 Échantillonnage et participants	32
2.1.1 Étude sur le vieillissement	32
2.1.2 Étude sur les plaques d'athéroscléroses.....	33
2.1.3 Étude sur l'hormone de croissance recombinante humaine.....	33

2.2 Préparation et conservation des échantillons	34
2.2.1 Isolement des cellules mononucléées du sang.....	34
2.2.2 Décongélation des PBMCs et purification des lymphocytes T CD4+.....	34
2.3 Quantification des réservoirs du VIH	35
2.3.1 Quantification de l'ADN viral	35
2.3.2 Quantification de l'ARN viral	37
2.3.3 TILDA	39
2.3.4 B15-dfQVOA	40
2.4 Quantification des TRECs.....	44
2.5 Séquençage de la boucle V3	45
2.5.1 Amplification de la boucle V3 de l'enveloppe virale	45
2.5.2 Séquençage de la boucle V3 et détermination de l'usage du corécepteur	47
2.6 Analyses phénotypiques par cytométrie en flux	47
2.6.1 Pureté et activation	47
2.6.2 Phénotypage des PBMCs.....	47
2.7 Analyses statistiques	49
Chapitre 3 : Résultats	51
3.1 Étude transversale sur l'association entre les facteurs liés au vieillissement et le réservoir viral	51
3.1.1 Données cliniques de l'étude	51
3.1.2 Impact du vieillissement sur la taille du réservoir du VIH	53
3.1.3 Évolution de la production thymique avec l'âge	54
3.1.4 Association entre la persistance virale et plusieurs marqueurs liés à l'âge.....	55
3.2 Étude transversale sur l'association entre le réservoir viral et le développement de plaques d'athérosclérose	62
3.3 Étude clinique longitudinale sur l'effet de la régénération thymique sur le réservoir	68
3.3.1 Description de l'étude hormone de croissance	68
3.3.2 Effet de l'administration d'hormone de croissance sur la production thymique	69
3.3.3 Effet de l'administration de l'hormone de croissance sur la taille du réservoir du VIH	71
3.3.4 Effet de l'administration de l'hormone de croissance sur le profil immunitaire	73
Chapitre 4 : Discussion.....	77
4.1 Association entre les facteurs liés au vieillissement et le réservoir viral	77
4.1.1 Le réservoir inductible est plus important chez les individus âgés.....	77

4.1.2 La fréquence des LT CD4+ naïfs influence les niveaux d'ADN viral total	78
4.1.3 La fréquence des LT CD8+ naïfs influence la fréquence des LT CD4+ portant de l'ADN viral inductible.....	80
4.1.4 Le phénotype immunologique associé au vieillissement est modifié dans un contexte d'infection par le VIH.....	81
4.2 Association entre le réservoir viral et le développement de plaques d'Athérosclérose	81
4.2.1 Le réservoir viral est plus grand chez les individus vivant avec le VIH qui ont développé des plaques d'athéroscléroses.....	82
4.2.2 Certains marqueurs de la persistance virale contribuent à prédire le développement de plaques d'athérosclérose.....	82
4.3 Étude clinique longitudinale sur l'effet de la régénération thymique sur le réservoir	83
4.3.1 L'injection d'hormone de croissance recombinante augmente la production thymique	84
4.3.2 L'ADN viral total est susceptible à une augmentation de la production thymique	85
4.3.3 L'administration de somatropine n'induit pas de changement marqué du phénotype immunologique.....	85
Chapitre 5 : Conclusion.....	87
Références	89

Liste des tableaux

Tableau 1. Séquence des sondes et des amorces utilisées pour les PCR quantitatives nichées visant à mesurer l'ADN total et intégré du VIH.....	36
Tableau 2. Conditions de préamplification pour les PCR quantitatives nichées	36
Tableau 3. Conditions d'amplification pour la seconde réaction des PCR quantitatives nichées. .	37
Tableau 4. Séquence des sondes et des amorces utilisées pour les PCR quantitatives nichées.....	38
Tableau 5. Conditions de préamplification pour les PCR quantitatives nichées	38
Tableau 6. Conditions d'amplification pour la seconde réaction des PCR quantitatives nichées. .	39
Tableau 7. Séquences des amorces et de la sonde utilisés pour la PCR nichée TILDA.....	40
Tableau 8. Conditions de préamplification pour le TILDA	40
Tableau 9. Conditions d'amplification pour la seconde PCR TILDA.....	40
Tableau 10. Séquence des sondes ou des amorces utilisées pour la PCR quantitative nichée TREC.....	44
Tableau 11. Conditions de préamplification pour la quantification des TRECs	45
Tableau 12. Conditions d'amplification pour la quantification des TRECs.....	45
Tableau 13. Séquence des amorces utilisées pour la PCR d'amplification de la boucle V3.....	46
Tableau 14. Conditions de préamplification pour la boucle V3.....	46
Tableau 15. Conditions d'amplification pour la seconde réaction des PCR de la boucle V3	46
Tableau 16. Données cliniques des participants à l'étude sur l'impact du vieillissement.....	52
Tableau 17. Données cliniques des participants à l'étude sur les plaques athérosclérotiques.....	63
Tableau 18. Régression logistique pour résultat binaire.....	66
Tableau 19. Résultat de tests ANOVA combinant chacun un facteur clinique ainsi qu'un marqueur de persistance du VIH, soit l'ADN viral total ou intégré.....	66
Tableau 20. Coefficient de régression des paramètres cliniques significativement associé à la présence de plaques d'athérosclérose dans un modèle de régression multiple régularisé.....	67
Tableau 21. Données cliniques à l'initiation de l'étude pour les participants de l'étude sur hormone de croissance.	68

Liste des figures

Figure 1. Estimation de la distribution des nouvelles infections au VIH en 2020 selon la population touchée (UNAIDS, 2020b).....	2
Figure 2. Cycle de réplication du VIH (Figure adaptée de Engelman & Cherepanov, 2012).....	5
Figure 3. Cinétique des évènements immunologiques et virologiques associés à l'infection par le VIH en phase aiguë et chronique précoce (Figure adaptée de Moir, Chun, & Fauci, 2011).....	8
Figure 4. Impact de la TAR sur l'espérance de vie supplémentaire d'un individu de 20 ans vivant avec le VIH dans un pays développé (UNAIDS, 2014).....	11
Figure 5. Modèle biexponentiel de la diminution de l'ADN du VIH selon le moment d'initiation du traitement (Hocqueloux et al., 2013).....	13
Figure 6. Mécanismes de persistance du réservoir.....	14
Figure 7. Taille du réservoir en fonction de la méthodologie utilisée (Figure adaptée de Deeks et al., 2016).....	19
Figure 8. Proportion des personnes vivant avec le VIH ayant plus de 50 ans, par région (Autenrieth et al., 2018).....	23
Figure 9. Coupe histologique montrant le phénomène de l'involution thymique et illustration de la diminution de la fréquence des cellules double positives (Lynch et al., 2009).....	26
Figure 10. Mécanismes contribuant au développement de l'athérogenèse chez les personnes vivant avec le VIH (Kearns, Gordon, Burdo, & Qin, 2017).....	29
Figure 11. Schéma du déroulement de l'étude clinique.....	34
Figure 12. Schéma de mise en culture d'un échantillon en QVOA à jour 3.	42
Figure 13. Stratégie d'identification des sous-populations cellulaires et des marqueurs phénotypiques.....	49
Figure 14. Taille du réservoir du VIH mesuré par différentes méthodes.....	53
Figure 15. Taille du réservoir viral par différentes méthodes de quantification selon le groupe d'âge des participants.....	53
Figure 16. Taille du réservoir inductible selon l'âge des participants (n=79).....	54
Figure 17. Activité thymique mesurée par différents marqueurs selon l'âge des individus.....	55
Figure 18. Fréquence des différents sous-types de lymphocytes.....	56
Figure 19. Matrice de corrélation des marqueurs de persistance virale et des variables étudiées.....	57
Figure 20. Corrélation entre l'ADN viral intégré ainsi que les marqueurs de la production thymique chez les LT CD4+.....	59

Figure 21. Corrélation entre divers marqueurs de la persistance virale et la fréquence de LT CD8+ naïfs mesurée par cytométrie en flux.....	60
Figure 22. Répartition de certains facteurs en fonction de l'usage du co-récepteur par le variant viral principal.	61
Figure 23. Fréquence de LT sénescents selon l'âge.	62
Figure 24. Association entre le développement de MCV sous-clinique et certains marqueurs de la persistance virale.	64
Figure 25. Corrélation entre le volume des plaques d'athérosclérose et les mesures de réservoir du VIH (n=37).....	65
Figure 26. Évolution des comptes CD4 et CD8 durant le traitement.	69
Figure 27. Effet de l'hormone de croissance sur la production thymique.....	70
Figure 28. Mesure de la taille du réservoir du VIH par différents marqueurs de la persistance virale dans l'étude hormone de croissance.	71
Figure 29. Effet de la prise d'hormone de croissance recombinante sur la taille du réservoir viral.	72
Figure 30. Effet de l'hormone de croissance sur la taille du réservoir du VIH selon le temps sous traitement.....	73
Figure 31. Fréquence des différentes sous-populations de LT avant l'initiation du traitement à l'hormone de croissance recombinante.	74
Figure 32. Effet du traitement à l'hormone de croissance recombinante sur les fréquences des sous-populations lymphocytaires.	75
Figure 33. Effet du traitement à l'hormone de croissance recombinante sur l'expression des marqueurs de prolifération, d'activation et de sénescence.	76

Liste des sigles et abréviations

ADCC	Cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps (<i>Antibody-dependant cellular-mediated cytotoxicity</i>)
ADN	Acide désoxyribonucléique
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	ARN messenger
ARV	Antirétroviraux
ATRA	Acide rétinoïque (<i>All-trans retinoic acid</i>)
BS	Sérum bovin (<i>bovine serum</i>)
BSA	Albumine de sérum bovin (<i>bovine serum albumine</i>)
CRP	Protéine C réactive (<i>C reactive protein</i>)
CT	Tomographie assistée par ordinateur (<i>Computed Tomography</i>)
DMSO	Diméthylsulfoxyde
dNTP	Désoxyribonucléoside Triphosphate
ELISA	Technique immuno-enzymatique sur support solide (<i>enzyme-linked immunosorbant assay</i>)
FBS	Sérum bovin fœtal (<i>bovine fetal serum</i>)
GH	Hormone de croissance (<i>growth hormone</i>)
IPDA	Essai permettant la mesure de l'ADN intégré intact (<i>Intact proviral DNA assay</i>)
MCV	Maladie cardiovasculaire
MSM	Homme ayant des relations sexuelles avec des hommes (<i>Man who have Sex with Men</i>)
PBMCs	Cellules mononucléaires du sang (<i>peripheral blood mononuclear cells</i>)
PBS	Tampon de phosphate salin (<i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	Amplification en chaîne par polymérase (<i>polymerase chain reaction</i>)
PMA	acétate de myristate de phorbol (<i>phorbol myristate acetate</i>)
qPCR	PCR quantitative
QVOA	Essai quantitatif de croissance virale (<i>quantitative viral outgrowth assay</i>)
rhGH	Hormone de croissance humaine recombinante (<i>recombinant human GH</i>)

RPMI	Milieu de culture pour cellules humaines (<i>Roswell Park Memorial Institute medium</i>)
R10	RPMI 10% FBS, 5% pénicilline/streptomycine
RTE	Émigrant thymique récent (<i>Recent Thymic Emigrant</i>)
SIDA	Syndrome de l'Immunodéficience acquise
TAR	Trithérapie antirétrovirale
Tcm	Lymphocyte T central mémoire
Tem	Lymphocyte T effecteur mémoire
TILDA	Essai de dilution limite de l'ARN tat/rev induit (<i>Tat/rev inducible limiting dilution assay</i>)
Tn	Lymphocyte T naïf
TRECs	Cercles d'exclusion du récepteur T (<i>T-cell Receptor Exclusion Circles</i>)
Trm	Lymphocyte T mémoire résidant dans les tissus
TSCM	Cellule T ayant des caractéristiques de cellules souches (« <i>T Stem Cell-like Memory</i> »)
Ttm	Lymphocyte T transitionnel mémoire
VIH	Virus de l'Immunodéficience Humaine
VIS	Virus de l'Immunodéficience Simienne

i stand
on the sacrifices
of a million women before me
thinking
*what can i do
to make this mountain taller
so the women after me
can see farther*

Legacy - Rupi Kaur

Remerciements

Tout d'abord, je voudrais remercier mon directeur de Maitrise, Nicolas, pour son soutien exceptionnel, son temps et sa confiance durant mes années au laboratoire. J'ai appris énormément à tes côtés depuis mes premières PCR en tant que stagiaire! Tu as été un excellent mentor, aussi passionné que passionnant. Je quitte avec un grand bagage en immunologie, mais également avec une meilleure éthique de travail et un réel désir de me dépasser.

À tous les membres du labo ainsi qu'à mes collègues et ami(e)s du CRCHUM, je tiens à vous remercier pour votre écoute, pour vos conseils et pour les doux moments de folie qui ont bercé ces deux années hautes en émotion! Vous êtes toustes si brillant(e)s et déterminé(e)s, vous m'avez énormément fait grandir. Je veux spécialement remercier Rémi, Pierre et Marta pour leur aide technique bien appréciée ainsi que Amélie pour son temps et son énergie contagieuse, malgré les longs QVOA. Je remercie également Louise pour avoir amorcé ce projet.

Je tiens à remercier mes parents ainsi que mes ami(e)s pour leurs encouragements et leur soutien dans les moments plus difficiles. Je voudrais également remercier Alain pour son incroyable support malgré la distance.

Merci aux IRSC ainsi qu'à la faculté de médecine de l'Université de Montréal pour leur support financier durant ma Maitrise. Je remercie également les nombreux collaborateurs et les nombreuses collaboratrices ainsi que les participant(e)s aux différentes études, sans qui ce projet n'existerait pas.

Finalement, je tiens à reconnaître que la majorité du travail présenté dans ce mémoire a été réalisé sur un territoire traditionnel non cédé. La Nation Kanien'kehá:ka (Mohawk) est reconnue comme la gardienne de la terre et des eaux de Tiohtiá:ke/Montréal.

Chapitre 1 : Introduction

1.1 Épidémiologie du VIH

1.1.1 Un problème à grande échelle

Le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) est à l'origine du syndrome de l'immunodéficience acquise (SIDA). Le VIH a causé la mort de plus de 32.7 millions de personnes dans le monde depuis son identification. L'épidémie de VIH est mondiale, touchant actuellement plus de 38 millions de personnes (Unaid, 2020a). De plus, puisqu'il n'existe actuellement pas de vaccin contre le VIH, un nombre important d'individus sont nouvellement infectés chaque année. En 2019, 1.7 million de personnes ont été nouvellement diagnostiquées, ce qui montre qu'il s'agit toujours d'un problème d'actualité malgré les avancées des dernières décennies (Unaid, 2020a). Même si personne n'est à l'abri de l'infection par le VIH, tous et toutes ne sont malheureusement pas égaux face à ce virus (Figure 1). Les hommes ayant des relations sexuelles avec des hommes (MSMs), les jeunes femmes, les travailleuses et travailleurs du sexe ainsi que les utilisateurs et les utilisatrices de drogues injectables sont parmi les individus les plus touchés par l'épidémie. De plus, 67% des personnes vivant avec le VIH vivent sur le continent africain (WHO, 2020). La disparité de prévalence entre les pays et les groupes d'individus peut s'expliquer en partie par la biologie du virus. Toutefois, la stigmatisation de certains de ces groupes, le manque d'information et de mesures de prévention adéquates ainsi que l'accès limité aux traitements sont des facteurs qui contribuent également au maintien du déséquilibre (Pettifor et al., 2011).

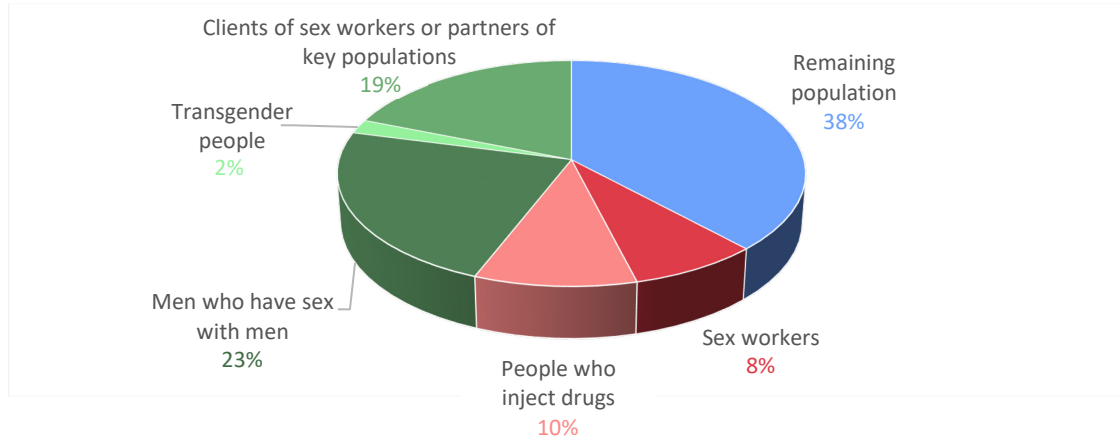


Figure 1. Estimation de la distribution des nouvelles infections au VIH en 2020 selon la population touchée (UNAIDS, 2020b).

Les données incluses proviennent de l'Asie et du Pacifique, des Caraïbes, de l'Europe de l'est et de l'Asie centrale, de l'Europe de l'ouest et centrale ainsi que de l'Amérique du Nord.

Néanmoins, le mouvement de mobilisation globale entourant ce virus a permis de faire considérablement diminuer le nombre de nouveaux cas et d'assurer un suivi adéquat des individus touchés. Des initiatives telles que les villes *fast track* permettent de s'approcher des cibles fixées par l'UNAIDS en matière de dépistage et de traitement (Brown et al., 2018). Toutefois, il faudrait un investissement commun massif pour permettre l'implantation de cette approche à l'échelle mondiale et tous les pays ne sont malheureusement pas équipés de la même façon pour atteindre ces objectifs (Levi et al., 2016; Stover et al., 2016). De plus, même si l'avènement de traitements permettant de freiner la progression du SIDA a permis d'améliorer drastiquement la qualité de vie des personnes infectées, il n'existe actuellement aucun traitement permettant de guérir définitivement du VIH. Cela place toutes les personnes infectées dans une situation de dépendance aux traitements actuels, lorsqu'elles ont la chance d'y avoir accès. Dans ce contexte, l'épidémie de VIH demeure importante et justifie donc les efforts encore déployés en recherche depuis une quarantaine d'années afin de permettre l'éradication définitive du virus.

1.1.2 Origine et identification du VIH

Depuis sa soudaine émergence au début des années 80, l'origine du VIH ainsi que sa pathogénicité unique ont été grandement étudiées. La première transmission semble s'être effectuée sur le continent africain plusieurs années avant que les scientifiques s'intéressent au virus, voire dans la première moitié du 20^e siècle (Korber et al., 2000; Worobey et al., 2008). Certaines formes de virus de l'immunodéficience simienne (VIS), qui sont rarement pathogéniques dans leur hôte d'origine, ont traversé la barrière d'espèce et évolué vers les différentes souches de VIH que nous connaissons aujourd'hui. Le VIH de type 1 est responsable de la plus grande partie de l'épidémie actuelle et il se subdivise en plusieurs lignées (M, N, O et P) qui résultent chacune d'un événement indépendant de transmission du singe à l'homme. Bien qu'ils puissent tous causer le SIDA, ces groupes sont présents à différents niveaux dans la population, en fonction de leur capacité d'infection et de réplication. Le groupe P provient du VISgor, retrouvé chez les gorilles, alors que l'origine du groupe O demeure encore incertaine. Les groupes N et M, dont le dernier est le plus prévalent, descendent quant à eux directement du VIScpz, retrouvé chez les chimpanzés (Sharp & Hahn, 2011). On retrouve au sein du groupe M plusieurs sous-types ayant été générés suite à la migration du virus et ces derniers sont répartis différemment dans la population. Le sous-type C est responsable du plus grand nombre d'infections et est retrouvé principalement en Afrique du sud ainsi qu'en Inde. Dans le reste de l'Afrique, on retrouve également les sous-types A et AG. Le sous-type B, quant à lui, est le plus prévalent en Europe, en Amérique et en Australie. Finalement, le sous-type le plus important en Asie est le AE (Buonaguro, Tornesello, & Buonaguro, 2007).

Le VIH de type 2 provient du mangabey fuligineux et est beaucoup moins répandu que le VIH de type 1 (Hirsch, Olmsted, Murphey-Corb, Purcell, & Johnson, 1989). Cela découle du fait qu'il se réplique de façon beaucoup plus lente et donc que la transmission entre les personnes est moins efficace (Popper et al., 2000). Néanmoins, on retrouve les lignées A et B du VIH-2 au sein de la population, respectivement en Afrique de l'ouest et en Côte d'Ivoire.

Malgré l'origine africaine du virus, les premiers cas de SIDA ont été recensés en 1981 aux États-Unis, où une vague d'infection à *Pneumocystis Carinii* est remarquée chez des MSM

et des utilisateurs de drogues à injection (Gottlieb et al., 1981; Masur et al., 1981). La plupart de ces patients présentaient également une lymphopénie ainsi que d'autres infections opportunistes, notamment à *Candida Albicans* et au virus de l'herpès associé au sarcome de Kaposi. Après deux ans d'incertitude, un nouveau virus à ARN ayant un tropisme pour les lymphocytes T est isolé d'un patient ayant des symptômes semblables aux cas préalablement recensés sur les côtes américaines (Barre-Sinoussi et al., 1983). Cette découverte a confirmé que nous faisons face à un nouvel agent infectieux et la composition des groupes infectés suggérait qu'il s'agissait d'un virus pouvant être transmis par le sang et par voie sexuelle. Suite à l'identification du VIH, de nombreuses études ont permis d'approfondir les connaissances sur ce virus et ainsi de mettre en lumière sa complexité.

1.2 L'infection par le VIH

1.2.1 Structure et mode de réplication

Le VIH est un rétrovirus à ARN enveloppé qui infecte les lymphocytes T CD4+. L'attachement à sa cellule cible ainsi que l'entrée vers le cytoplasme sont médiés par la glycoprotéine d'enveloppe gp120 (Kwong et al., 1998). Elle interagit avec le récepteur CD4 ainsi que le corécepteur CCR5 ou CXCR4, selon le sous-type (Dalglish et al., 1984; Dragic et al., 1996; Feng, Broder, Kennedy, & Berger, 1996; Klatzmann et al., 1984). La majorité des infections se font avec des souches virales utilisant le co-récepteur CCR5, ce qui explique la présence plus importante de ce type de variants dans la population. Toutefois, il est connu que le tropisme du virus évolue pour utiliser davantage le co-récepteur CXCR4 au cours de l'infection (Bleul, Wu, Hoxie, Springer, & Mackay, 1997). À une moindre échelle, les macrophages peuvent aussi être infectés (Alkhatib et al., 1996).

protéine Vpr facilite la migration en entravant la progression de la phase G2/M. Lors d'une infection productive, les protéines virales accessoires sont produites en premier. Parmi celles-ci, les facteurs Nef et Vpu permettent notamment de diminuer l'expression du récepteur CD4 et des molécules CMHI à la surface de la cellule, ce qui la protège d'une nouvelle infection et de la reconnaissance par les cellules effectrices. Le facteur Vif, quant à lui, contrecarre l'action du facteur de restriction cellulaire APOBEC3G dans les cellules nouvellement infectées, empêchant ainsi l'apparition d'hypermutations dans le génome viral au cours de la rétrotranscription (Malim & Bieniasz, 2012). Les protéines structurelles, telles que les protéines de capsid et d'enveloppe, sont également produites et le génome viral complet est transcrit. Les virions sont assemblés à la membrane cellulaire et la protéine Gag médie les différentes étapes d'assemblage des virions, telles que la réorganisation de la membrane cellulaire ainsi que l'encapsidation de l'ARN génomique via la séquence Ψ . Pour permettre le bourgeonnement adéquat des virions immatures, Vpu interagit avec la protéine virale tétherine, qui retient normalement les nouvelles particules virales à la surface cellulaire. Finalement, la protéine Gag est clivée par une protéase virale, ce qui permet la maturation des particules virales (Sundquist & Krausslich, 2012).

Dans certains cas, l'intégration du génome viral à celui de l'hôte ne se solde pas par une infection productive. En effet, le VIH peut parfois demeurer dans un état latent au sein de la cellule hôte. La transcription et l'initiation de la réplication virale dépendent de la présence de facteurs cellulaires, tels que NF- κ B et AP-1. Ainsi, ce phénomène est étroitement lié au statut d'activation cellulaire (Duverger et al., 2013; Hiscott, Kwon, & Genin, 2001). De plus, l'environnement épigénétique, certains facteurs intrinsèques au VIH ainsi que certains facteurs cellulaires influencent la balance entre l'infection productive et la latence. Dans les conditions adéquates, les facteurs nécessaires à l'initiation de la réplication, la machinerie de transcription cellulaire ainsi que les protéines régulatrices Tat et Rev contribuent à la production des ARN messagers (ARNm) viraux.

Le tropisme du VIH, les divers mécanismes mis en place pour détourner la réponse cellulaire ainsi que sa capacité à entrer dans un état latent contribuent à la complexité de ce virus. De plus, le fait qu'il infecte les LT CD4⁺ est en partie responsable du développement de l'immunodéficience acquise caractéristique de l'infection par le VIH.

1.2.2 Pathogénicité

L'infection par le VIH peut être divisée en plusieurs phases et se caractérise par une déplétion des lymphocytes T CD4. Tout d'abord, le virus peut être transmis par différentes voies, soit par le sang lors de transfusion ou de l'utilisation de seringues souillées, par les muqueuses lors de relations sexuelles non protégées ainsi que par transmission verticale *in utero* ou durant l'allaitement. Dans tous les cas, une sélection de la population virale s'effectue et souvent, un seul variant viral est responsable de l'initiation de l'infection (Abrahams et al., 2009; Keele et al., 2008; Li et al., 2010).

La première phase pathogénique de l'infection par le VIH, la phase aiguë, se caractérise par une dissémination rapide du virus et par l'activation de la réponse immunitaire. Le développement de cette phase est relativement uniforme d'une personne à l'autre, indépendamment de la voie d'infection, et se divise en différents stades Fiebig hiérarchisés selon le développement de la réponse immunitaire (Fiebig et al., 2003) (Figure 3). La phase aiguë est souvent asymptomatique, bien qu'elle puisse être accompagnée de symptômes apparentés à la grippe ainsi que de lésions cutanées. Dès son entrée, le virus se réplique rapidement dans les muqueuses, particulièrement au niveau du tractus gastro-intestinal, ce qui cause une déplétion accrue des lymphocytes T CD4 à cet endroit ainsi que la destruction des tissus lymphoïdes associés à l'intestin (Brenchley et al., 2004; Mehandru et al., 2004). Les différents mécanismes responsables de la baisse drastique du compte CD4 demeurent seulement partiellement compris, mais il est connu que la réponse immunitaire ainsi que, dans une moindre mesure, la cytopathogénicité directe du VIH jouent un rôle important. Le virus se dissémine ensuite dans de nombreux tissus, plus particulièrement au niveau des organes lymphoïdes secondaires tels que les ganglions lymphatiques, ce qui mène à une augmentation graduelle de la virémie (Mattapallil et al., 2005; Z. Zhang et al., 1999). Malgré la dissémination rapide du virus, la réponse immunitaire spécifique du VIH se développe lentement durant toute la phase aiguë, ce qui contribue à la déplétion lymphocytaire. Au stade Fiebig IV, la pression immunitaire exercée sur le virus permet finalement une diminution marquée de la charge virale plasmatique ainsi qu'une hausse progressive du compte lymphocytaire en périphérie. Toutefois, les lymphocytes T CD4+ demeurent sévèrement déplétés au niveau des muqueuses, ce qui contribue à la perte de

leur intégrité. Lors du tout dernier stade Fiebig, la capacité mutagène du VIH permet l'évasion immunitaire successive, ce qui pousse à un équilibre entre la réponse immunitaire et la propagation virale. Cela se traduit par l'atteinte d'un point de virémie stable ainsi que par l'entrée en phase chronique.

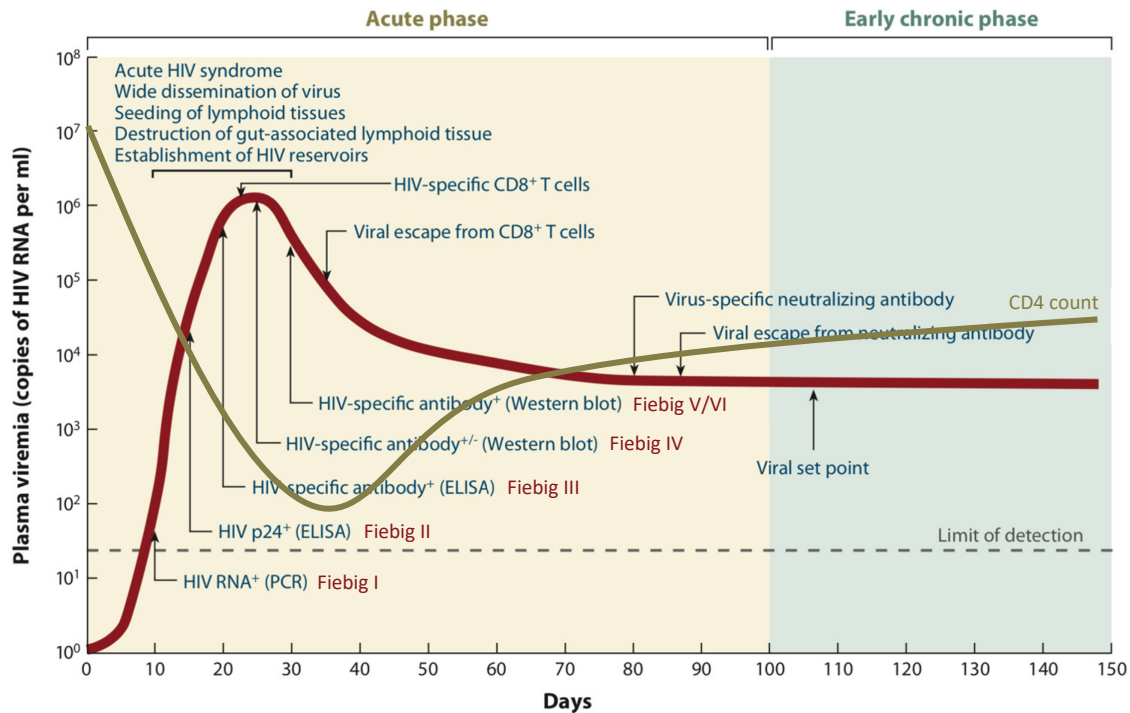


Figure 3. Cinétique des événements immunologiques et virologiques associés à l'infection par le VIH en phase aiguë et chronique précoce (Figure adaptée de Moir, Chun, & Fauci, 2011).²

La phase chronique se caractérise principalement par de l'inflammation systémique ainsi que par une déplétion graduelle des lymphocytes T CD4. Elle dure plusieurs années et évolue très différemment selon les individus infectés. Le niveau d'activation immunitaire est probablement le facteur le plus prédictif de la progression clinique du VIH. En effet, il a été montré que l'absence de pathologie chez l'hôte naturel du SIV, caractérisé par un compte CD4 stable, est associée à un niveau d'inflammation significativement diminué malgré une réplication virale abondante (Silvestri et al., 2003). Dans un contexte d'infection pathogénique, l'activation immunitaire est notamment causée par la persistance antigénique du VIH ainsi que par l'importante translocation microbienne qui s'effectue au

² Adapté avec la permission de Copyright Clearance Center: Annual Reviews, Annu Rev Pathol, Pathogenic mechanisms of HIV disease, Moir, S., Chun, T. W., Fauci, A. S. 2011

niveau des muqueuses de l'intestin (Brenchley et al., 2006; Mehraj et al., 2020). En effet, l'incapacité à restaurer l'immunité mucoale durant la phase chronique mène à un bris de l'intégrité de la barrière intestinale, ce qui permet l'entrée de produits bactériens vers le système sanguin. Ces phénomènes causent la stimulation continue des cellules immunitaires innées et adaptatives, ce qui cause leur épuisement et l'expression de marqueurs régulateurs tels que PD-1. Puisque la qualité de la réponse spécifique au VIH est associée au contrôle de l'infection et que l'épuisement affaiblit la réponse contre les cellules infectées par le VIH, ce phénomène contribue à la progression clinique de la maladie (Betts et al., 2006; Rosenberg et al., 1997; Trautmann et al., 2006). Il a été montré que le blocage des récepteurs associés à l'épuisement, tel que PD-1, permet de rétablir la fonction des cellules effectrices et contribue à une meilleure élimination des cellules infectées ex vivo (Barber et al., 2006; Day et al., 2006). Ainsi, la qualité des réponses adaptatives spécifiques du VIH se dégrade au cours de l'infection chronique, ce qui mène au développement du SIDA.

La phase SIDA se caractérise par une baisse du compte CD4 jusqu'à moins de 200 cellules/ μ l et par l'incapacité de lutter contre des pathogènes opportunistes, tels que ceux responsables de la candidose, de certaines pneumonies ou du sarcome de Kaposi. L'apparition de certains cancers, comme le lymphome non hodgkinien, est également associée avec la progression clinique du VIH. Sans traitement, le développement du SIDA est inévitable chez la plupart des individus séropositifs et les complications finissent malheureusement par causer le décès. Toutefois, certaines personnes vivant avec le VIH, appelées des contrôleurs, ont la capacité de maîtriser leur virémie durant la phase chronique et développent rarement les symptômes associés au SIDA. Même s'il semble que cette résistance soit conférée par certains traits génétiques, tels que le profil HLA, il existe une hétérogénéité importante au sein de ce groupe d'individus et les mécanismes expliquant le contrôle spontané de leur virémie font encore l'objet d'intenses recherches (Migueles et al., 2000; Pereyra et al., 2008). Pour les autres personnes vivant avec le VIH, des traitements antirétroviraux permettent de contrôler la réplication virale et ainsi limiter la progression clinique de l'infection.

1.2.3 Limiter la progression de l'infection : la thérapie antirétrovirale

Les traitements antiviraux utilisés dans le contexte du VIH permettent d'inhiber la réplication virale et freinent ainsi la progression de l'infection. Les inhibiteurs nucléosidiques de la transcription inverse (INTIs), tels que l'AZT, ont été les premières molécules offertes aux personnes vivant avec le VIH vers la fin des années 1980 et ils étaient disponibles sous forme de comprimés à prise quotidienne. Leur utilisation empêche la transcription inverse du génome viral, ce qui permet de limiter l'infection de nouvelles cellules et donc de réduire significativement la charge virale plasmatique chez les individus vivant avec le VIH. Ce traitement permet de réduire l'inflammation et d'augmenter le compte CD4 (Fischl et al., 1987). Toutefois, les nombreux effets secondaires engendrés par la toxicité des composés, la réticence de la communauté face à ces nouveaux agents, le besoin d'une adhérence quotidienne ainsi que l'accessibilité au traitement constituaient des obstacles importants au traitement des personnes vivant avec le VIH à l'époque. De plus, le développement de résistance à ces inhibiteurs uniques était très répandu, ce qui se traduisait par un retour de la production virale chez un grand nombre d'individus (Larder, Darby, & Richman, 1989). Suite à la diversification des classes d'agents disponibles, principalement grâce à l'apparition des inhibiteurs de protéase, la trithérapie antirétrovirale (TAR) fait son apparition en 1996 et constitue un virage déterminant dans la lutte contre le VIH. Il s'agit d'un régime combinant divers agents, généralement de plusieurs classes, permettant ainsi de cibler différentes enzymes virales simultanément. Cette caractéristique confère non seulement un pouvoir antiviral supérieur, elle permet également une diminution du développement de résistance, ce qui se traduit en une efficacité augmentée. Les nouvelles générations d'antirétroviraux (ARV) étant composés d'agents puissants mais peu toxiques, ils causent moins d'effets secondaires et sont largement acceptés par les communautés. La plus récente classe d'agents, les inhibiteurs de l'intégrase, sont particulièrement efficaces, autant chez les patients naïfs au traitement que chez les personnes ayant développé une résistance aux autres inhibiteurs. De plus, l'initiation rapide de la thérapie suite au diagnostic est maintenant coutume, ce qui assure une restauration plus efficace du compte lymphocytaire (Kitahata et al., 2009). Ainsi, à l'ère de la TAR hautement active, l'infection par le VIH est devenue une maladie chronique pour la

majorité des personnes vivant avec le VIH à l'échelle mondiale. En plus de prévenir le développement du SIDA et les effets secondaires de l'infection par le VIH, la TAR permet également d'augmenter considérablement l'espérance de vie des personnes infectées (Figure 4). De plus, en rendant le virus indétectable dans le sang et de nombreux tissus, elle permet de freiner la transmission de ce dernier, ce qui permet de réduire le nombre de nouvelles infections et d'alléger la charge mentale des individus vivant avec le VIH (Eisinger, Dieffenbach, & Fauci, 2019). Ainsi, il est indéniable que la TAR a eu un impact significatif sur la qualité de vie des personnes qui y ont accès.

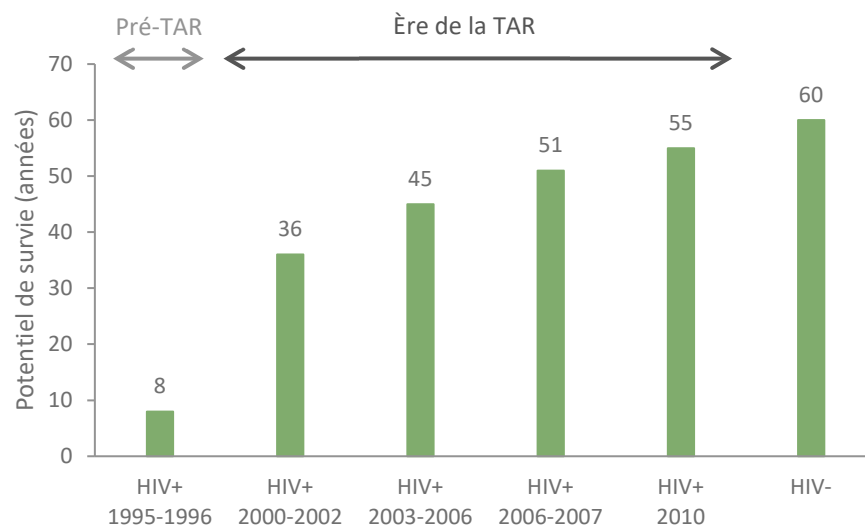


Figure 4. Impact de la TAR sur l'espérance de vie supplémentaire d'un individu de 20 ans vivant avec le VIH dans un pays développé (UNAIDS, 2014)

Toutefois, la prise quotidienne d'agents antirétroviraux constitue toujours un frein majeur au traitement de millions de personnes, que ce soit par manque d'accessibilité, par peur de stigmatisation ou simplement par incompatibilité avec le quotidien de certains individus. Ainsi, des stratégies alternatives à la TAR, ayant également pour but de limiter l'infection de nouvelles cellules, sont actuellement explorées. Par exemple, l'utilisation des anticorps neutralisants (bNAbs) contre les particules virales du VIH, retrouvés naturellement chez une partie des individus infectés, est étudiée dans un contexte thérapeutique. Il a été montré que l'administration bimensuelle d'une combinaison de bNAbs permettait de retarder significativement le rebond viral suite à l'arrêt du traitement, sans développement de résistance (Bar-On et al., 2018; Mendoza et al., 2018). De plus, plusieurs techniques de

relâchement graduel des composés de la TAR, telle que l'injection de nanoparticules contenant les agents thérapeutiques, sont également à l'étude (Edagwa, McMillan, Sillman, & Gendelman, 2017). Bien que ces approches pourraient permettre d'espacer la prise des agents antiviraux, elles ne permettent toujours que de limiter la progression de l'infection, sans éliminer les cellules infectées. Cela constitue réellement la plus grande limite des thérapies actuelles. En effet, lorsque le traitement est interrompu, on assiste systématiquement à un rebond rapide de la virémie plasmatique à partir des cellules précédemment infectées (Colby et al., 2018; Davey et al., 1999; Henrich et al., 2017).

1.3 Les réservoirs du VIH

1.3.1 Le VIH persiste malgré la TAR

Les réservoirs du VIH sont responsables du rebond viral lors de l'arrêt de la TAR. Ces derniers sont composés de différents types cellulaires persistant dans de nombreux sites anatomiques malgré la thérapie. Les LT CD4⁺ infectés de façon latente, c'est-à-dire qui portent un virus intégré transcriptionnellement inactif, mais capable de produire des produits viraux suite à une stimulation, constituent le compartiment cellulaire le plus important pour la persistance virale (Chun et al., 1997; Finzi et al., 1997; Wong et al., 1997). Le réservoir s'établit dès le début de l'infection et se développe majoritairement avant l'initiation du traitement (Abrahams et al., 2019; Brodin et al., 2016). Il a d'ailleurs été montré que l'initiation rapide de la TAR permet de limiter l'infection des tissus, ce qui réduit l'établissement du réservoir ainsi que la déplétion des CD4⁺ (Garcia-Broncano et al., 2019; Hocqueloux et al., 2013; Leyre et al., 2020). De plus, l'initiation du traitement est associée à une diminution rapide du nombre de cellules portant de l'ADN viral. En effet, les cellules productivement infectées ayant une courte demi-vie, telles les cellules effectrices ou les macrophages, sont rapidement éliminées (Honeycutt et al., 2017). Toutefois, l'hétérogénéité du réservoir cellulaire fait que cette phase de décroissance rapide est suivie d'une seconde phase beaucoup plus lente qui représente la longue demi-vie du réservoir (Figure 5). En effet, de nombreuses cellules infectées de façon latente ont une durée de vie extrêmement longue, ce qui fait que le réservoir ne peut être éliminé uniquement par les thérapies antirétrovirales et persiste indéfiniment sous TAR (Crooks et

al., 2015; Finzi et al., 1999; Siliciano et al., 2003). La persistance virale est assurée par plusieurs mécanismes.

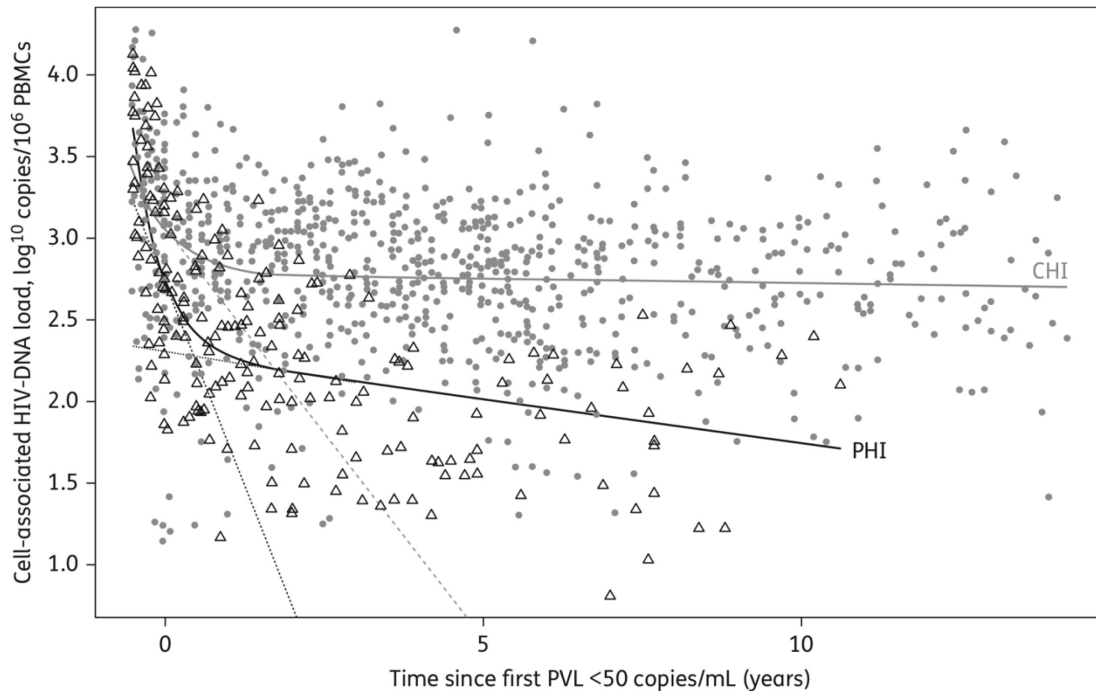


Figure 5. Modèle biexponentiel de la diminution de l'ADN du VIH selon le moment d'initiation du traitement (Hocqueloux et al., 2013)³

CHI : Individus traités en phase chronique, PHI : individus traités en phase aiguë

1.3.2 Mécanismes de la persistance virale

Le premier mécanisme de persistance du VIH est la survie à long terme des cellules infectées de façon latente. Par exemple, il a été montré que les cellules T ayant des caractéristiques de cellules souches (TSCM), caractérisées par une demi-vie extrêmement longue, constituent une partie importante du réservoir du VIH et que leur contribution augmente avec le temps sous TAR (Buzon et al., 2014; Jaafoura et al., 2014). De plus, puisque la réplication virale durant la phase aiguë se déroule principalement dans les organes lymphoïdes secondaires, la localisation des cellules CD4 peut également avoir un

³ Reproduit avec la permission de Springer Nature Customer Service Centre GmbH: Oxford University Press, *J Antimicrob Chemother*. Long-term antiretroviral therapy initiated during primary HIV-1 infection is key to achieving both low HIV reservoirs and normal T cell counts. Hocqueloux, L., Avettand-Fenoel, V., Jacquot, S., Prazuck, T., *et al.* Copyright © 2013

impact sur leur participation au réservoir. En effet, les cellules Th17, Th1, Th17/Th1 ainsi que celles exprimant les récepteurs CCR6 et CXCR3 contribuent de façon importante à la persistance virale (Banga et al., 2016; Khoury et al., 2016; Lee et al., 2017; Planas et al., 2017; Sun et al., 2015). Toutefois, le compartiment cellulaire le mieux caractérisé en termes de persistance virale se retrouve au sein des LT CD4+ mémoires, particulièrement dans les centrales (Tcm), transitionnelles (Ttm) et effectrices (Tem) mémoires (Chomont et al., 2009). D'autre part, il est admis que les LT CD4+ naïfs contribuent de façon beaucoup moins importante au réservoir du VIH. Toutefois, les souches virales utilisant le corécepteur CXCR4 sont fréquemment retrouvées dans ce sous-type cellulaire (Bleul et al., 1997; Roche et al., 2020). Les différents types cellulaires contribuant au réservoir persistent sous TAR grâce à leur stabilité intrinsèque, mais également grâce à leur capacité d'évasion des mécanismes effecteurs. En effet, les cellules portant des génomes intégrés sont enrichies pour l'expression divers marqueurs connus pour inhiber la réponse immunitaire, tels que PD-1, TIGIT et LAG-3 (Fromentin et al., 2016; Pardons, Baxter, et al., 2019). De plus, la prolifération des cellules portant de l'ADN viral intégré contribue grandement à la persistance du VIH.

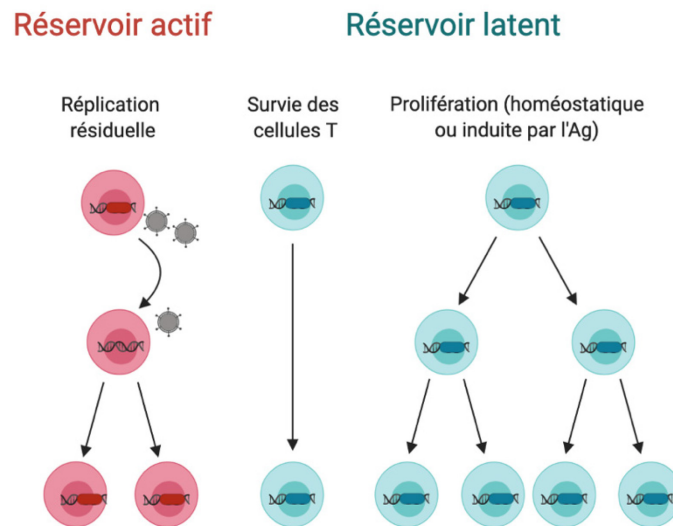


Figure 6. Mécanismes de persistance du réservoir

En effet, la prolifération des LT CD4+ constitue le principal facteur régissant l'homéostasie du réservoir viral et cela se reflète dans la grande clonalité du réservoir viral (Bui et al., 2017; Cohn et al., 2015; Gantner et al., 2020; Hosmane et al., 2017; Simonetti et al., 2016; von Stockenstrom et al., 2015). La prolifération du réservoir latent peut se faire par

différents mécanismes. Premièrement, la prolifération homéostatique médiée par l'IL-7 permet la persistance du VIH (Chomont et al., 2009). L'IL-7 contribue au maintien de l'homéostasie de la niche lymphocytaire en induisant la prolifération des LT CD4+ mémoires ainsi que des cellules naïves (Seddon, Tomlinson, & Zamoyska, 2003). Son action est notamment reflétée par une augmentation du compte CD4 suite l'injection de cette cytokine dans un contexte de lymphopénie (Levy et al., 2009; Sereti et al., 2009). Toutefois, la prolifération des cellules portant de l'ADN viral est intrinsèquement liée à la taille du réservoir viral. Ainsi, il a été montré que l'injection d'IL-7 dans un contexte thérapeutique mène à une augmentation de la taille du réservoir, telle que déterminée par la fréquence des cellules portant de l'ADN viral intégré (Vandergeeten et al., 2013). De plus, dans un contexte de prolifération homéostatique, la cellule n'est pas activée et le provirus demeure latent, ce qui empêche sa reconnaissance par les cellules effectrices (Bosque, Famiglietti, Weyrich, Goulston, & Planelles, 2011). Ensuite, des études récentes ont montré que les cellules du réservoir sont davantage clonales que le reste des LT CD4+ et qu'il y a un renouvellement fréquent des clones principaux. Ces observations ne sont pas en accord avec un processus prolifératif continu seulement lié à la prolifération homéostatique et suggèrent que la prolifération influencée par les antigènes joue un rôle important dans la persistance virale (Gantner et al., 2020; Mendoza et al., 2020; Wang et al., 2018). Finalement, l'intégration du VIH dans certains sites, notamment dans des gènes associés au cancer, peut promouvoir la prolifération de ces cellules (Maldarelli et al., 2014; Wagner et al., 2014). Ainsi, les sites d'intégration du virus, l'IL-7 et la stimulation antigénique contribuent à la persistance virale via la prolifération des LT CD4+ infectés de façon latente.

Ces phénomènes contribuant à maintenir le réservoir sont particulièrement bien caractérisés dans le sang, mais il a été montré que le VIH persiste dans de nombreux tissus lors de la thérapie. Par exemple, le tissu lymphoïde associé à l'intestin et, dans une moindre mesure, le tractus génital constituent non seulement des sites de réplication importants durant l'infection aiguë, mais ils participent aussi de façon majeure au réservoir viral sous TAR (Cantero-Perez et al., 2019; Chun et al., 2008). De plus, dans une étude post-mortem, l'équipe de Chaillon et al. a identifié la présence d'ADN viral dans plus de 28 tissus (Chaillon et al., 2020). Dans la plupart de ces sites anatomiques, un autre mécanisme

contribue à la persistance des réservoirs viraux au fil du traitement. En effet, il est possible qu'une réplication résiduelle à bas bruit persiste dans quelques compartiments tissulaires, ce qui contribuerait au maintien du réservoir sous TAR, bien que ce phénomène demeure controversé. Cela pourrait être notamment causé par une mauvaise pénétration des agents antiviraux (Estes et al., 2017; Fletcher et al., 2014; Lorenzo-Redondo et al., 2016). De plus, certains de ces sites anatomiques, tels que les organes lymphoïdes secondaires et les organes immunoprivilégiés, sont également marqués par une absence de cellules effectrices cytotoxiques (Connick et al., 2007; Fukazawa et al., 2015), ce qui pourrait contribuer au renouvellement continu du réservoir. Les cellules nouvellement infectées pourraient contribuer massivement au rebond viral lors de l'arrêt de la thérapie, ce qui souligne l'importance de ce mécanisme (Boritz et al., 2016). En effet, il est plus probable que ces cellules contiennent du virus compétent pour la réplication, ce qui les distingue de la majorité du réservoir viral qui est constitué d'une majorité de provirus présentant des défauts ne permettant pas de produire des particules virales infectieuses.

1.3.3 Réservoir viral et génomes défectifs

Toutes les cellules portant de l'ADN viral n'ont pas la même capacité à causer le rebond viral suite à l'arrêt de la TAR. En effet, au fil de l'infection naturelle (non traitée), on assiste à une évolution génétique du VIH causée par l'accumulation de mutations. Ces dernières peuvent contribuer à l'évasion immunitaire avant l'initiation de la TAR, mais elles peuvent également rendre les virus non compétents pour la réplication. Ainsi, la plupart des cellules composant le réservoir viral sont considérées comme ne pouvant pas contribuer au rebond viral lors de l'arrêt de la TAR, puisque les provirus qu'elles portent n'ont plus la capacité de produire des virions infectieux en raison de mutations délétères. De plus, les cellules contenant des génomes viraux intacts sont soumises à une plus grande pression immunitaire, ce qui fait que leur fréquence diminue au fil de l'infection (Bruner et al., 2016; Peluso et al., 2020). Toutefois, sans produire des particules virales infectieuses, les génomes non compétents pour la réplication peuvent produire des produits viraux immunogènes, comme de l'ARN ou des protéines virales (Imamichi et al., 2016). Ceci pourrait expliquer pourquoi la taille globale du réservoir, mesurée par la fréquence des cellules portant de l'ADN viral, intact ou non, est corrélée positivement à la fréquence des

cellules exprimant des marqueurs d'activation, tels que CD38 et HLA-DR (Cockerham et al., 2014; Hatano et al., 2013; Khoury et al., 2017). Bien que la contribution exacte des différentes formes de réservoir à la pathologie du VIH demeure incomprise, le rôle du réservoir intact dans le rebond viral suite à l'interruption de la TAR ainsi que dans l'inflammation chronique est largement établi. Ainsi, il est essentiel de pouvoir déterminer la taille du réservoir.

1.3.4 Mesurer le réservoir viral

Plusieurs méthodes permettent de quantifier le réservoir viral, mais donnent des résultats sensiblement différents (Eriksson et al., 2013). En effet, la balance entre la spécificité et la sensibilité de l'essai détermine le type d'évènements qui seront mesurés (Figure 7). Puisque les différents types de génomes viraux contribuent de façon différente au réservoir, il est intéressant de pouvoir les comparer. Par exemple, la fréquence de cellules portant des génomes viraux intégrés peut être déterminée par amplification en chaîne par polymérase quantitative (qPCR), d'une part grâce à des amorces spécifiques à un fragment du gène gag, et d'autre part à des amorces spécifiques aux séquences Alu réparties dans le génome humain (Mexas et al., 2012; Vandergeeten et al., 2014). Cette technique est très sensible, requiert peu de cellules et peut s'effectuer rapidement. Toutefois, la quantification par qPCR n'est pas nécessairement appropriée, car elle surestime grandement le réservoir et ne prend pas en considération la compétence des génomes pour la réplication (Eriksson et al., 2013). En effet, bien que la quantité d'ADN viral intégré corrèle avec le nombre de génomes viraux ayant la capacité de causer le rebond viral, une grande partie des provirus intégrés ne peuvent générer des particules virales infectieuses comme nous l'avons discuté précédemment (Bruner et al., 2016; Chun et al., 1997; Kiselina et al., 2016). L'essai quantitatif de la croissance virale (QVOA), quant à lui, est considéré comme la méthode de référence pour mesurer le réservoir viral compétent pour la réplication (Eriksson et al., 2013; Finzi et al., 1997; Richman et al., 2019). Les CD4+ latentes sont cultivées en dilution limite puis activées *in vitro*, ce qui permet la propagation des virus compétents pour la réplication. Après plusieurs jours de culture, la protéine de capsid p24 présente dans le surnageant est quantifiée par technique immuno-enzymatique sur support solide (ELISA) et le nombre d'unités virales infectieuses par million de cellules est obtenu en utilisant la

méthode du maximum de vraisemblance. Toutefois, le QVOA nécessite énormément de cellules et de temps, ce qui limite son utilisation dans plusieurs contextes. De plus, certains provirus compétents pour la réplication ne sont pas induits par les agents permettant la réactivation, ce qui explique que cette méthode sous-estime la véritable taille du réservoir (Ho et al., 2013). Il est possible d'inférer la capacité des génomes intégrés à générer différents produits viraux via l'étude de la séquence virale. Les techniques reposant sur le séquençage quasi complet des provirus, tel que le FLIPS, peuvent s'effectuer au niveau de la cellule unique et permettent une analyse poussée des génomes viraux (Hiener et al., 2017). D'autre part, les techniques à haut débit comme le *intact proviral DNA assay* (IPDA), qui visent à quantifier les génomes ne présentant pas de mutation dans des régions fréquemment mutées et donc potentiellement intacts, permettent une analyse globale et rapide du portrait viral d'un individu (Bruner et al., 2019). Ces méthodes reposent sur le postulat que les séquences intactes, c'est-à-dire les génomes viraux intégrés qui n'ont pas de larges délétions ou d'hypermutations, sont toutes capables de produire des virions infectieux. Or, il a été montré que la modulation épigénétique agit comme un élément important de la régulation de l'expression du VIH, ce qui suggère que certains génomes intacts ne produiront pas nécessairement de particules infectieuses, même après une forte stimulation de la cellule infectée de façon latente. Ainsi, malgré les nombreux avantages de ces essais, l'estimation de la taille du réservoir viral compétent pour la réplication demeure imparfaite.

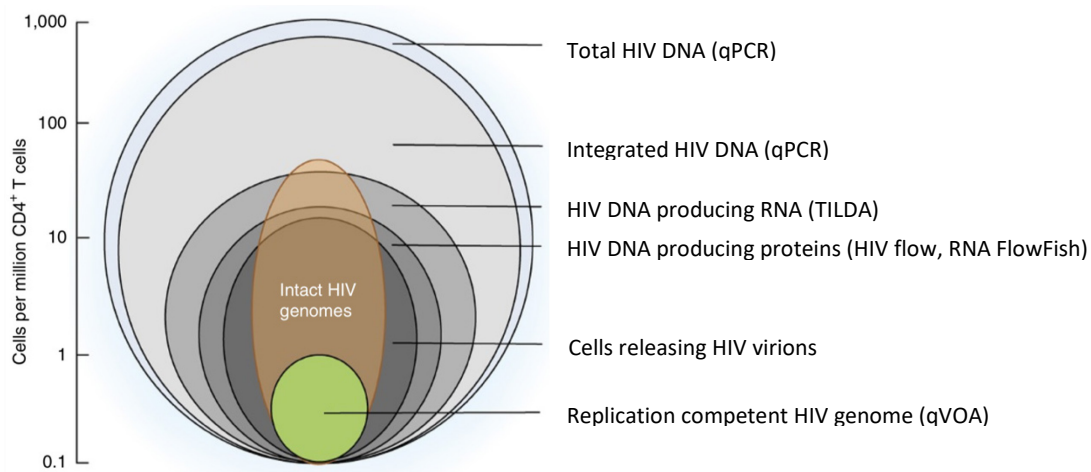


Figure 7. Taille du réservoir en fonction de la méthodologie utilisée (Figure adaptée de Deeks et al., 2016)⁴

Sans être impliqués dans le rebond viral, les génomes défectifs peuvent participer à la pathologie du VIH en contribuant à l'activation immunitaire soutenue (Imamichi et al., 2016). Ainsi, l'estimation de la capacité des provirus à générer différents produits viraux permet non seulement d'estimer la taille du réservoir, mais également d'évaluer l'importance du rôle des cellules infectées dans l'inflammation. Notre laboratoire s'est spécialisé dans le développement de ce type de méthodes. En premier lieu, les cellules portant un génome viral compétent pour la transcription peuvent être évaluées grâce à l'essai de dilution limite de l'ARN *tat/rev* induit (TILDA) (Procopio et al., 2015). Cette méthode repose sur la quantification des ARNm des gènes *tat* et *rev* induits suite à la stimulation de lymphocytes T CD4+. Grâce à des dilutions limites, la fréquence des génomes pouvant produire des ARN multiépissés peut être calculée. Puisque cette méthode est basée sur une PCR quantitative nichée, elle est rapide, reproductible et peut s'effectuer sur un grand nombre de cellules, ce qui permet une quantification précise malgré la rareté des événements. D'autre part, des techniques d'analyse par cytométrie en flux, telles que le RNA Flow-FISH ainsi que le HIV-Flow, permettent d'évaluer la taille du réservoir compétent pour la traduction, en plus de permettre un phénotypage des cellules portant ces

⁴ Reproduit avec la permission de Springer Nature Customer Service Centre GmbH: Springer Nature, Nature Medecine. International AIDS Society global scientific strategy: towards an HIV cure 2016. Deeks, S. G., Lewin, S. R., Ross, A. L. *et al.* Copyright © 2016

provirus capables de produire des protéines virales (Baxter et al., 2017; Pardons, Baxter, et al., 2019). Suite à la réactivation des génomes viraux, des anticorps couplés à des fluorochromes et spécifiques de la protéine virale p24 permettent de caractériser phénotypiquement le réservoir au niveau de la cellule unique. Bien que cela comporte de nombreux avantages, l'étude de ces événements rares requiert un nombre important de cellules et ne peut donc pas être effectuée dans tous les contextes. Finalement, il peut être intéressant d'étudier l'activité résiduelle du réservoir sous TAR plutôt que sa capacité à générer des produits viraux suite à sa réactivation. Cela peut notamment être établi par la mesure par amplification en chaîne par polymérase (PCR) des différents transcrits viraux produits spontanément par les cellules.

En résumé, l'information désirée, l'expertise détenue par un laboratoire donné ainsi que le nombre de cellules disponibles sont des facteurs déterminants dans le choix de la méthode de mesure du réservoir viral. La combinaison de plusieurs de ces techniques peut permettre de dresser un portrait plus complet du réservoir viral chez un patient et ainsi de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans sa persistance. De plus, puisque la diminution de la taille du réservoir viral est au cœur de nombreuses stratégies thérapeutiques, ces techniques sont essentielles pour étudier l'efficacité de ces dernières.

1.3.5 Cibler le réservoir viral

Plusieurs stratégies thérapeutiques ont été proposées pour permettre une rémission à long terme, voire une guérison, des personnes vivant avec le VIH. Deux approches sont possibles: un traitement stérilisant, menant à une élimination totale du virus, ou un traitement fonctionnel, c'est à dire qui mène à un contrôle du réservoir par le système immunitaire lors du retrait de la thérapie antirétrovirale. Dans tous les cas, les différentes stratégies visent une diminution du nombre de cellules infectées avant l'interruption de la TAR, puisqu'une baisse du nombre d'évènements d'intégration est associée au contrôle virologique (Williams et al., 2014). À ce jour, seulement deux individus sont considérés comme ayant été guéris du VIH suite à une cure stérilisante (Gupta et al., 2020; Hutter et al., 2009). La stratégie thérapeutique utilisée s'inscrit dans un contexte unique, où les individus ont dû se soumettre à un traitement immunosuppresseur ainsi qu'à une

transplantation de cellules souches suite au développement d'une leucémie myéloïde. L'intervention se base sur le principe que l'expression du corécepteur CCR5 chez un individu est essentielle à l'infection par le VIH (Samson et al., 1996). Ainsi, les LT de ces deux patients ont été remplacées par des cellules résistantes portant une mutation dans le gène du corécepteur CCR5 qui ne permet pas la fusion des particules virales avec la membrane cellulaire. Bien qu'efficace, cette approche est évidemment trop risquée pour être appliquée à large échelle, et la compatibilité des cellules donneurs/receveurs avec la contrainte d'un donneur portant une mutation rare (moins de 1% à l'état homozygote) constitue un autre obstacle important. Dans une autre optique, des technologies novatrices d'édition du génome, telle que CRISPR-Cas9, permettent de considérer une cure stérilisante obtenue directement par l'inactivation de l'ADN viral du génome de l'hôte (Dash et al., 2019; W. Hu et al., 2014). Toutefois, des études plus poussées quant à l'utilisation de cette technologie dans des cellules somatiques doivent être réalisées, surtout en ce qui a trait à sa spécificité et ses effets à long terme. Bien que ces stratégies semblent prometteuses, elles sont risquées et peu accessibles. Plus réalistes, les interventions menant à une guérison fonctionnelle sont considérées comme une alternative.

La première approche, le « *shock and kill* », consiste en une réactivation des génomes latents pour permettre la reconnaissance et l'élimination des cellules infectées par le système immunitaire. Les agents inverseurs de la latence ciblent des mécanismes cellulaires (épigénétique, facteurs de transcription) qui ont pour but de mener à la réactivation transcriptionnelle des provirus latents. Par exemple, l'utilisation de mimétiques du SMAC ou des agonistes de PKC activent la voie NFκB et semblent permettre une réactivation des provirus intégrés autant dans le sang que dans les tissus (Nixon et al., 2020). Les HDACi, quant à eux, permettent la décondensation de la chromatine au niveau du génome viral et leur efficacité a été montrée *ex vivo* (Bartholomeeusen, Fujinaga, Xiang, & Peterlin, 2013). De plus, l'utilisation de bloqueurs de point de contrôle immunitaires (comme les anticorps bloquant PD-1) *ex vivo* permettent de rendre les virus intégrés plus prône à la réactivation en présence d'agents inverseurs de la latence (Fromentin et al., 2019). Malgré ces résultats prometteurs, les différents agents sont associés à une grande toxicité aux doses requises et ils ont des impacts variés sur les

différents sous-types cellulaires, ce qui suggère qu'ils ne ciblent qu'une partie des réservoirs du VIH (Pardons, Fromentin, Pagliuzza, Routy, & Chomont, 2019). De plus, l'élimination subséquente des cellules dans lesquelles le VIH est réactivé demeure hypothétique. En effet, il est nécessaire de stimuler l'immunité pour permettre une réduction des cellules infectées, puisque la réponse immunitaire est compromise dans un contexte d'infection par le VIH et que les effets cytopathiques du virus ne sont pas suffisants. Il a été montré que la préstimulation des LT CD8+ par des peptides viraux pouvait permettre l'élimination des cellules suite à la réactivation *in vitro* (Shan et al., 2012). De plus, la vaccination thérapeutique visant à stimuler l'immunité innée et spécifique, par des agonistes de TLR7 et une combinaison Ad26/MVA respectivement, a montré une amélioration marquée du contrôle viral suite à l'arrêt de traitement (Borducchi et al., 2016). Finalement, l'utilisation de molécules mimétiques du CD4 permettrait d'augmenter l'élimination des cellules infectées grâce à la cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps (ADCC) (Haynes et al., 2012; Richard et al., 2015).

La seconde approche d'importance dans la quête d'une cure fonctionnelle est celle du « *block and lock* ». Cette stratégie repose sur l'utilisation de composés permettant d'induire la latence complète des génomes viraux afin de prévenir définitivement le rebond viral lors de l'arrêt de la TAR. Il a été montré que plusieurs molécules ont la capacité d'inhiber la réactivation virale et même d'entraîner des changements épigénétiques à long terme, ce qui permettrait le maintien d'un stade de latence profond suite au retrait du composé (Mousseau et al., 2015). Toutefois, cette approche demeure théorique, puisqu'aucune étude clinique ne fait état de son efficacité. Ainsi, aucune stratégie thérapeutique n'est actuellement considérée comme alternative viable à la TAR, qui doit être prise à vie. Pour permettre aux individus vivant avec le VIH de s'affranchir de ce traitement sans faire face au rebond viral, il est nécessaire d'approfondir notre compréhension des mécanismes de persistance des réservoirs du VIH, une étape cruciale au développement de stratégies qui permettront de les éliminer. Le processus de vieillissement est connu pour avoir un impact sur la progression clinique du VIH, mais sa relation avec le réservoir viral demeure incomprise.

1.4. Vieillir avec le VIH

1.4.1 L'inflammation chronique

Avec l'amélioration de l'efficacité des traitements antiviraux ainsi que leur accessibilité accrue dans de nombreux pays, l'espérance de vie des personnes vivant avec le VIH est significativement prolongée (Samji et al., 2013). Cela cause un changement démographique, qui se traduit par une augmentation de la proportion des individus infectés ayant plus de 50 ans, particulièrement en Amérique du nord et en Europe (Figure 8).

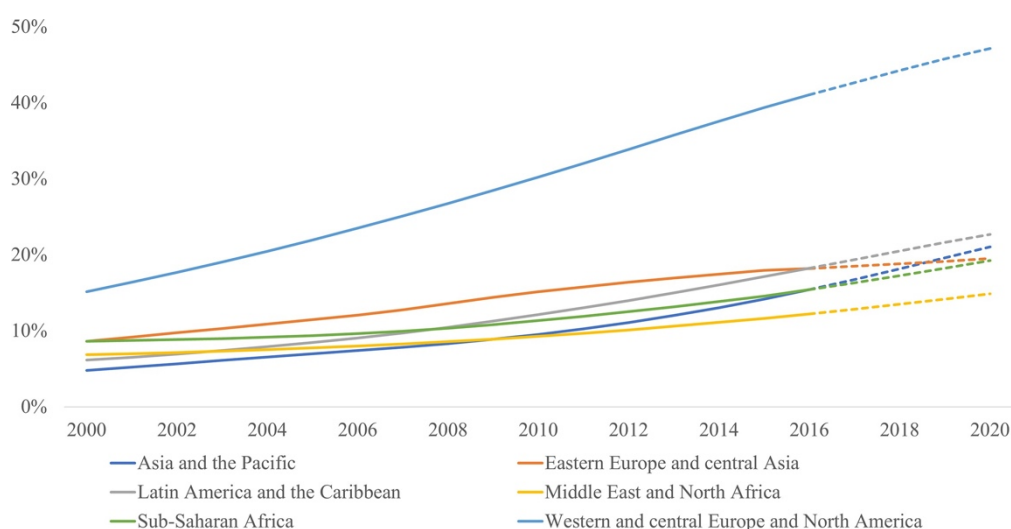


Figure 8. Proportion des personnes vivant avec le VIH ayant plus de 50 ans, par région (Autenrieth et al., 2018)

Il est connu que l'âge est un facteur qui influence de manière significative le cours de la maladie chez les personnes vivant avec le VIH (Egger et al., 2002). En effet, la restauration du compte lymphocytaire est moins optimale chez les personnes plus âgées que chez les personnes jeunes, ce qui se traduit par une progression clinique plus importante (Grabar et al., 2004). De plus, en général, le profil immunitaire des personnes plus âgées est défini par l'*inflammaging*, un phénomène caractérisé par la sénescence des cellules immunitaires, c'est-à-dire qu'elles sont plus rares, moins fonctionnelles, plus activées et plus différenciées. Les cellules sénescents ont généralement un potentiel de prolifération limité et sont caractérisées par la perte d'expression de CD28 ainsi que par le gain d'expression

de CD57 (Merino et al., 1998). L'inflammation associée à l'âge est également caractérisée par une surexpression de cytokines pro-inflammatoires, telles que l'IL-6 et le TNF- α . Ce phénomène est principalement dû aux nombreuses phases d'activation et de contraction de la réponse immunitaire au fil des années, mais également à la modification des profils de glycosylation des IgG, à la dysbiose intestinale ainsi qu'à l'accumulation de débris cellulaires et de facteurs de coagulation (Freund, Orjalo, Desprez, & Campisi, 2010; Sanada et al., 2018). L'activation soutenue ainsi que la réponse immunitaire défaillante sont étroitement liées au développement de maladies associées à l'âge, telles que l'athérosclérose et le cancer. Il a d'ailleurs été montré que les personnes vivant jusqu'à 100 ans montrent des bas niveaux de cytokines pro-inflammatoires (Franceschi et al., 2007; Vasto et al., 2007).

De nombreuses études montrent que l'*inflammaging* est exacerbé dans un contexte d'infection par le VIH et que, même sous TAR efficace, l'activation immunitaire est plus importante chez les individus infectés (Appay, Almeida, Sauce, Autran, & Papagno, 2007; Deeks, 2009; Desai & Landay, 2010). En effet, la persistance du virus dans des réservoirs cellulaires contribue au maintien de la stimulation antigénique par la réplication virale à bas bruit et la production de produits viraux immunogènes (Khoury et al., 2017). De plus, la réplication virale abortive issue du réservoir latent cause la lyse des cellules infectées par pyroptose, un processus hautement inflammatoire (Doitsh et al., 2014). Cela se traduit par une augmentation du taux d'activation cellulaire, de la production de cytokines pro-inflammatoires et de certains marqueurs de coagulation, en plus de contribuer à la sénescence des cellules spécifiques du VIH par leur stimulation constante (Brenchley et al., 2003; Tomiyama et al., 2000). Bien que ce phénomène soit global, l'inflammation au niveau du tractus gastro-intestinal est particulièrement élevée à cause de l'important réservoir qui s'y trouve. Cette inflammation locale contribue à la destruction de la barrière muqueuse et à l'augmentation de la translocation microbienne, ce qui à son tour, stimule la production de cytokines pro-inflammatoires (Deeks, Lewin, & Havlir, 2013; McGowan et al., 2004). De plus, puisque l'expression du marqueur CD57 est associée à une baisse de la production d'IL-2, la réponse T régulatrice est affaiblie et ne peut contenir la réponse

inflammatoire (Garcia-Broncano et al., 2019). Ainsi, lors de l'infection chronique au VIH, le profil immunitaire est semblable à celui associé au vieillissement.

Ce phénotype immunitaire particulier semble être interdépendant avec la taille du réservoir. En effet, plusieurs conséquences de l'activation chronique contribuent en retour à la persistance virale. Premièrement, non seulement les cellules activées sont elles plus permissives à l'infection, certaines cytokines pro-inflammatoires, telles que IL-6 et TNFalpha, peuvent promouvoir la réplication résiduelle en réactivant le virus latent (Saleh et al., 2011). De plus, certaines cytokines pro-inflammatoires, telles que IFNgamma, stimulent la différenciation des LT, ce qui permet le maintien du réservoir en plus de générer de nouvelles cibles cellulaires pour l'infection résiduelle. Finalement, le phénotype de sénescence causé par l'inflammation chronique affecte la réponse effectrice contre les cellules du réservoir. L'accumulation de LT très différenciés résulte notamment en un répertoire lymphocytaire peu diversifié et fonctionnel, et la perte de CD28 sur les LT CD4+ nuit à la capacité de prolifération des cellules B ainsi qu'à la production des anticorps.

La communauté scientifique s'accorde sur le fait que le processus de vieillissement doit être considéré lors de l'élaboration de nouvelles approches thérapeutiques (Effros et al., 2008). Toutefois, même si l'âge est étroitement lié à l'inflammation et que cette dernière contribue à la persistance virale, très peu d'études ont évalué l'association entre le vieillissement et le réservoir du VIH. De plus, d'autres phénomènes associés à l'âge avancé, tels que l'involution thymique, sont étroitement liés à l'homéostasie lymphocytaire et ont le potentiel de contribuer à la persistance virale.

1.4.2 Involution thymique et homéostasie lymphocytaire dans un contexte de VIH

L'involution thymique est caractérisée par une modification de l'architecture du thymus et d'une diminution de sa production. En effet, on observe avec l'âge une augmentation de l'espace périvasculaire du thymus au détriment du cortex et de la médulla, ce qui se traduit par un organe plus petit et moins performant. L'involution thymique est marquée par un défaut de la maturation des thymocytes et une réduction de la production *de novo* des LT (Figure 9).

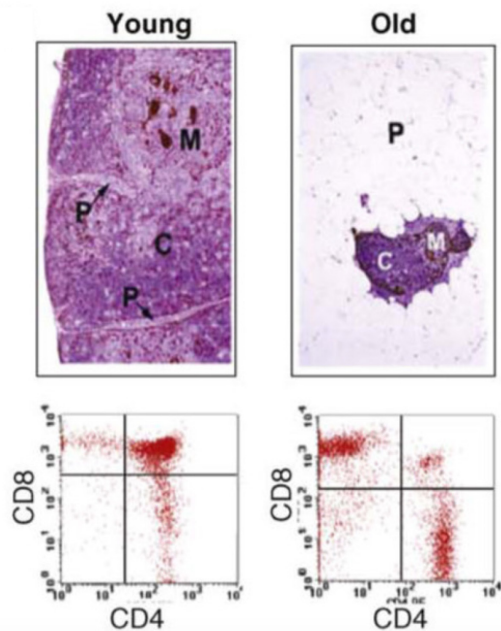


Figure 9. Coupe histologique montrant le phénomène de l'involution thymique et illustration de la diminution de la fréquence des cellules double positives (Lynch et al., 2009)⁵

P : espace périvasculaire, C : cortex, M : médulla.

L'involution thymique peut être évaluée par imagerie, mais la quantification de la production lymphocytaire est plus pertinente dans un contexte immunologique. Cette dernière peut être évaluée de différentes façons. Premièrement, l'expression du marqueur CD31 (PECAM-1) à la surface des LT CD4⁺ naïfs, tel que mesurée par cytométrie en flux, permet de quantifier les cellules récemment émigrées du thymus (RTE) (Tanaskovic, Fernandez, Price, Lee, & French, 2010). En effet, les LT CD4⁺ perdent l'expression de ce marqueur suite à leur activation et lors de leur différenciation en cellules mémoires, ce qui n'est pas le cas pour les LT CD8⁺ (Newman et al., 2018). Une alternative consiste à déterminer la fréquence des cercles d'excision du récepteur T (TRECs) dans les lymphocytes T. Ces produits extrachromosomaux sont contenus dans les cellules fraîchement émigrées du thymus et ne se répliquent pas durant la mitose, ce qui crée un

⁵ Reproduit avec la permission de Copyright Clearance Center: Elsevier, Trends Immunol. Thymic involution and immune reconstitution. Lynch, H. E., Goldberg, G. L., *et al.* Copyright © 2009

effet de dilution lorsque les cellules prolifèrent en périphérie. Ainsi, la quantification des TRECs permet d'évaluer l'histoire proliférative des lymphocytes T au niveau populationnel et donc d'évaluer l'impact de l'involution thymique sur l'homéostasie lymphocytaire en périphérie (Douek et al., 1998).

Dans un contexte d'infection par le VIH, où la niche des lymphocytes T CD4⁺ circulants est déplétée, la production thymique est liée de façon importante à l'homéostasie lymphocytaire. En effet, la génération de nouveaux LT est un facteur important de la reconstitution immunitaire et elle permet une augmentation de la proportion de LT CD4⁺ naïfs non infectés. Toutefois, lorsque la production thymique est altérée par le phénomène d'involution, le mécanisme principal de reconstitution est plutôt la prolifération homéostatique des cellules naïves périphériques (Ferrando-Martinez et al., 2011). En effet, dans ce contexte, l'IL-7 est majoritairement responsable de l'expansion de la niche via son action sur les LT. Cette cytokine est produite par les cellules stromales de manière assez constante et sa disponibilité est dictée par le nombre de cellules pouvant la métaboliser ainsi que par l'expression des récepteurs d'IL-7 à leur surface. Ainsi, plus le nombre de LT circulant est bas, plus les niveaux d'IL-7 sont élevés (Mazzucchelli & Durum, 2007). La production *de novo* des LT contribue normalement à la régulation de cette cytokine et à l'homéostasie lymphocytaire. L'involution thymique augmente ainsi le poids de la prolifération dans le maintien de la niche. Puisque ce phénomène est étroitement lié à la persistance virale, il est étonnant que peu d'études aient évalué l'association entre la production thymique et les marqueurs de persistance virale.

L'hormone de croissance (GH) permet la régénération thymique via la reconstruction de la matrice extracellulaire (Taub, Murphy, & Longo, 2010). Il a été montré que l'administration de GH chez des individus séropositifs avait pour effet d'augmenter la production thymique, ce qui a un impact positif sur le compte CD4 (Napolitano et al., 2008; Smith et al., 2010). Il a également été montré que cela avait un effet positif sur le profil immunitaire, notamment sur la réponse spécifique au VIH et l'activation immunitaire (Herasimtschuk et al., 2013; Plana et al., 2011). Toutefois, ces études sont très limitées et aucune tendance claire n'a été établie entre la production thymique et la taille du réservoir viral. Néanmoins, ces études montrent l'importance de considérer l'involution thymique

dans la relation entre le vieillissement et l'infection par le VIH. Il est d'ailleurs connu que ce processus contribue au développement du syndrome métabolique ainsi qu'à l'apparition de comorbidités chez les personnes vivant avec le VIH (Guaraldi et al., 2019). Ces phénomènes sont étroitement liés avec le niveau d'inflammation et augmentent en prévalence avec l'âge.

1.4.3 Maladies cardiovasculaires et infection par le VIH

L'inflammation est le principal facteur contribuant au développement de plaques athérosclérotiques, la cause dominante de maladies cardiovasculaires (Ross, 1999). En effet, on observe une fréquence accrue de monocytes activés, de facteurs de coagulations ainsi que des cytokines pro-inflammatoires dans ce contexte (Ait-Oufella, Taleb, Mallat, & Tedgui, 2011; Popa, Netea, van Riel, van der Meer, & Stalenhoef, 2007; Yang, Zhang, Yu, Yang, & Wang, 2014) (Figure 10). Puisque l'âge avancé est étroitement lié à ce phénomène, les maladies cardio-vasculaires (MCV) sont graduellement plus prévalentes chez les personnes vivant avec le VIH en raison de leur espérance de vie accrue depuis le développement des thérapies antirétrovirales (Kaplan, Hanna, & Kizer, 2016; Rodriguez-Penney et al., 2013). Toutefois, il est connu que les individus séropositifs, même sous TAR efficace, ont un risque accru de développer un infarctus du myocarde par rapport aux personnes non infectées par le VIH. Certains facteurs de risques traditionnels, tels que la dyslipidémie, le diabète ou le tabagisme, sont plus élevés chez les personnes vivant avec le VIH. Toutefois, ces facteurs ne sont pas entièrement responsables de la disparité entre les deux groupes, puisque cette dernière persiste même lorsqu'on corrige pour les facteurs de risques traditionnels (Althoff et al., 2015; Freiberg et al., 2013; Triant, Lee, Hadigan, & Grinspoon, 2007).

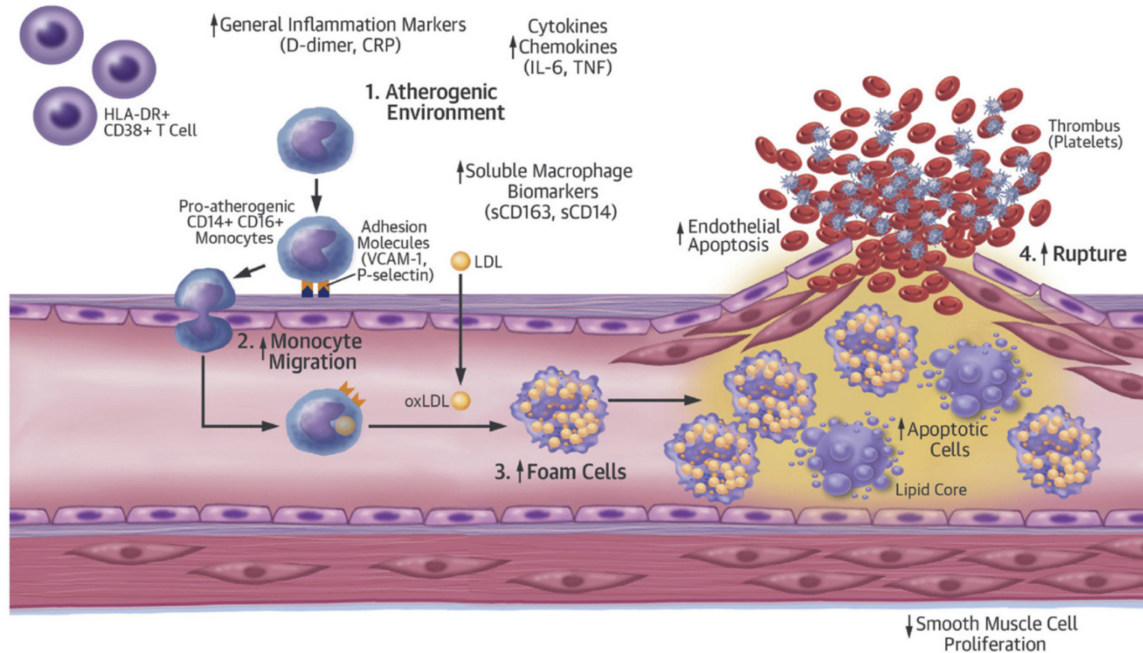


Figure 10. Mécanismes contribuant au développement de l'athérogenèse chez les personnes vivant avec le VIH (Kearns, Gordon, Burdo, & Qin, 2017)⁶

Il a été montré que plusieurs facteurs d'inflammation étroitement associés au développement de MCV sont augmentés lors de l'infection au VIH, même sous TAR efficace (Neuhaus et al., 2010; Ramji & Davies, 2015; So-Armah et al., 2016). Les cytokines IL-6 et TNFalpha ainsi que les facteurs de coagulation D-dimer et protéine C réactive (CRP) ont été identifiés comme des biomarqueurs importants pour la prédiction de maladies cardiovasculaires chez les individus infectés (Duprez et al., 2012). Les cytokines pro-inflammatoires contribuent notamment à l'expression de molécules d'adhésion à la surface des LT et des cellules endothéliales, ce qui augmente l'infiltration de cellules immunitaires au niveau des artères et stimule l'inflammation locale. Ce phénomène contribue ainsi à l'initiation de la formation des plaques (Hsue, Deeks, & Hunt, 2012). Ainsi, le profil inflammatoire particulier des individus vivant avec le VIH semble contribuer à leur risque de développer des MCV. Toutefois, les mécanismes associés au développement de cette co-morbidité dans le contexte spécifique de l'infection au VIH demeurent peu connus. Considérant le rôle important de la persistance virale dans

⁶ Reproduit avec la permission de Copyright Clearance Center: Elsevier, J Am Coll Cardiol. HIV-1–Associated Atherosclerosis : Unraveling the Missing Link. Kearns, A., Gordon, J., Burdo, T. H., Qin, X. Copyright © 2017

l'établissement d'un profil inflammatoire, il est surprenant qu'aucune équipe n'ait recherché de relation entre le développement de MCV et la persistance virale, jusqu'à tout récemment (McLaughlin et al., 2020).

1.5 Hypothèses du projet

Bien que la TAR ne permette pas d'éliminer complètement le VIH, elle contribue à l'amélioration de la qualité de vie des individus vivant avec ce virus et augmente grandement leur espérance de vie. Dans les pays où l'utilisation de la TAR est répandue, on assiste depuis quelques années au vieillissement de la population infectée par le VIH. Il est bien connu que de nombreux changements immunologiques s'opèrent avec l'âge, tant au niveau cellulaire que systémique. De plus, l'âge est un facteur important pour la progression clinique de l'infection par le VIH ainsi que pour le développement de comorbidités, telles que les maladies cardiovasculaires. Bien que les réservoirs du VIH soient responsables du rebond viral suite à l'interruption de la TAR et soient considérés comme le principal obstacle à l'éradication du VIH, leur relation avec le vieillissement est peu connue.

Hypothèses: Le vieillissement exacerbe la persistance virale chez les individus vivant avec le VIH, grâce à deux mécanismes complémentaires. 1) L'involution thymique entraîne une réduction de la production thymique, caractérisée par un moindre apport en LT CD4+ non infectés et en LT CD8+ effecteurs. Cette absence de pression homéostatique et immunologique appliquée sur le réservoir viral se traduit par une persistance virale plus importante chez les personnes plus âgées. 2) L'*inflammaging* contribue à la prolifération des cellules portant le réservoir du VIH et nuit aux processus effecteurs menant à leur élimination. Puisque le maintien du réservoir contribue à aggraver le contexte pro-inflammatoire, le réservoir viral pourrait être un facteur important dans le développement prématuré de maladies cardiovasculaires chez les individus vivant avec le VIH.

Le premier objectif de ce projet est d'identifier la relation entre la réduction de la production thymique au cours du vieillissement et divers facteurs associés à la persistance virale.

Le deuxième objectif est d'évaluer l'association entre la taille du réservoir viral et la présence de plaques d'athérosclérose chez les individus vivant avec le VIH.

Finalement, le troisième objectif est d'étudier l'impact de la régénération thymique sur la persistance virale et sur différents facteurs immunologiques via l'administration d'hormone de croissance recombinante dans un contexte thérapeutique.

Chapitre 2 : Matériel et méthode

2.1 Échantillonnage et participants

Pour chacun des objectifs de ce projet, des échantillons sont obtenus auprès de personnes vivant avec le VIH. Ces participants sont des hommes et des femmes nord-américain(e)s sous thérapie antirétrovirale efficace. Ainsi, les participants présentent une charge virale indétectable pour toutes les visites rapportées dans les différentes études, soit moins de 50 copies d'ARN du VIH/mL de plasma. Ils sont principalement infectés avec du VIH-1 de sous-type B, avec quelques individus portant des virus appartenant aux sous-types A/AG ou G, bien que cette information ne soit pas connue pour l'ensemble des participants. Finalement, chaque étude a été approuvée par un comité d'éthique et les participants ont tous donné leur consentement libre et éclairé.

2.1.1 Étude sur le vieillissement

Cette étude a pour but d'étudier la relation entre le vieillissement et la taille des réservoirs du VIH. Elle résulte d'une collaboration avec des partenaires situés à Montréal ainsi qu'à Port Sainte-Lucie en Floride et rassemble des échantillons utilisés dans différents projets. Les participants sont sélectionnés en fonction du nombre de cellules disponibles pour analyse et de leur respect du critère d'inclusion, soit d'être sous TAR depuis au moins 3 ans. Au total, cette étude comporte 88 participants pour lesquels un seul échantillon a été analysé. 4.5% des participantes sont des femmes et le type de TAR est connu pour environ 66% des participants. Parmi ces derniers, 16 ont un traitement à base d'inhibiteurs d'intégrase, 15 à base de NNRTI, 14 à base d'inhibiteurs de protéase et 1 à base de bloqueurs de CCR5. De plus, 8 participants ont un régime thérapeutique contenant 3 différentes classes d'agent et 4 ont un régime thérapeutique ayant une seule classe d'agent. Les échantillons analysés, provenant soit d'une leukaphérèse ou d'une prise de sang, ont été collectés entre mars 2000 et février 2018. Les cellules mononucléaires du sang (PBMCs) ont été isolées à partir des échantillons frais.

2.1.2 Étude sur les plaques d'athéroscléroses

La *Canadian HIV Aging Cohort Study* (CHACS) est une étude pancanadienne financée par les Instituts de Recherche en Santé du Canada. Elle a pour but d'étudier les facteurs contribuant au développement de maladies cardiovasculaires chez les personnes de sexe masculin d'au moins 40 ans vivant avec le VIH. La cohorte de cette étude est constituée de plusieurs centaines de personnes, dont 112 individus participent également à un sous-projet portant sur l'imagerie cardiovasculaire. Dans le cadre de notre étude, 59 de ces participants ont été inclus. Le volume total de leurs plaques d'athérosclérose, un indicateur de MCV sous-clinique, a été mesuré par tomographie cardiaque (CT) assistée par ordinateur avec injection de produit de contraste (collaboration des Drs Madeleine Durand et Carl Chartrand Lefebvre) et des prélèvements sanguins ont été effectués à plusieurs points temporels, comme précédemment décrit (Durand et al., 2017). Notre étude étant transversale, un seul échantillon sanguin a été utilisé par participant et ces derniers ont été récoltés entre mars 2013 et octobre 2016. Les PBMCs ont été isolées à partir du sang frais. Le type de traitement antirétroviral au moment du prélèvement ne nous a pas été divulgué.

2.1.3 Étude sur l'hormone de croissance recombinante humaine

Cette étude de preuve de concept a pour but d'évaluer l'effet de l'hormone de croissance recombinante humaine (rhGH) sur la taille du réservoir de VIH compétent pour la réplication chez des individus sous TAR. Cet essai clinique préliminaire a été mis sur pied en collaboration avec des partenaires situés à Montréal (Dr Jean-Pierre Routy) et a été réalisé en partenariat avec EMD Serono. Un total de 12 participants ont été recrutés, dont deux étaient des femmes. L'étude consiste en une injection quotidienne de rhGH durant une période de 48 semaines. La rhGH est approuvée pour l'administration chez les personnes vivant avec le VIH et est normalement utilisée pour contrer la lipodystrophie. Pour les 24 premières semaines, 3mg/jour d'hormone sont injectés, puis 1.5mg/jour sont administrés pour les 24 dernières semaines, comme précédemment décrit (Napolitano et al., 2008) (Figure 11). Les participants ont un rendez-vous 2 semaines avant l'initiation de l'étude ainsi que des rendez-vous de suivi toutes les 12 semaines, pendant lesquels du sang est prélevé, pour un total maximal de 6 échantillons par patients. Les PBMCs sont extraites du sang frais et au total, 49 échantillons ont été analysés. Ces derniers ont été prélevés entre

janvier 2017 et septembre 2019. Le type de traitement antirétroviral au moment du prélèvement ne nous a pas été divulgué.

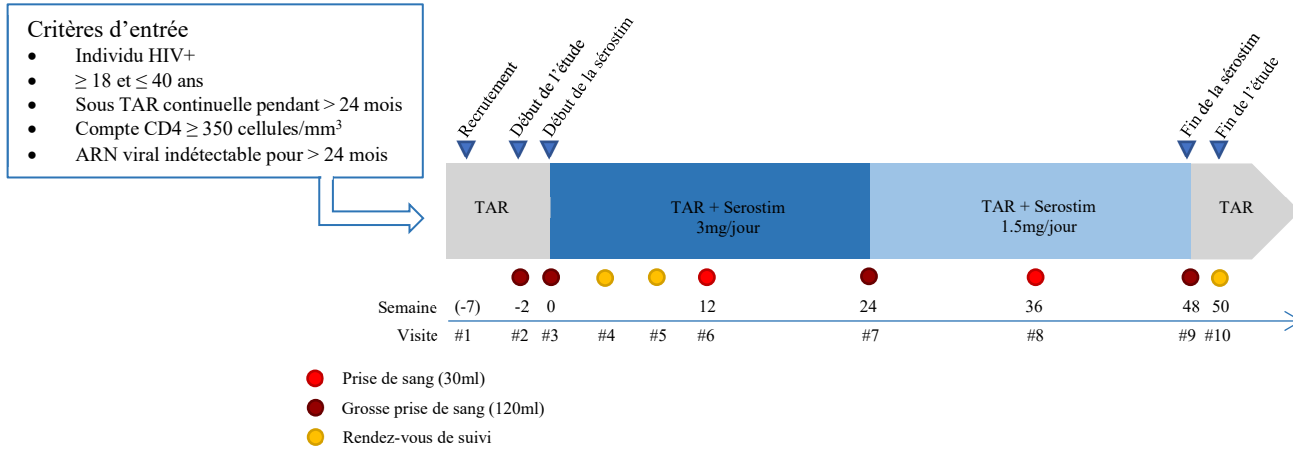


Figure 11. Schéma du déroulement de l'étude clinique

2.2 Préparation et conservation des échantillons

2.2.1 Isolement des cellules mononucléées du sang

Les cellules mononucléées sont isolées par gradient de Ficoll (Lymphoprep, Stemcell); 15ml de Ficoll sont délicatement déposés sur 30ml de sang, recueillis suite à un prélèvement sanguin ou une leukaphérèse et dilués 1 :3 dans du milieu de culture pour cellules humaines (RPMI). Suite à une centrifugation de 25 min à 2 000 rpm, l'anneau de PBMCs visible à l'œil est prélevé à la pipette Pasteur. Les cellules sont ensuite lavées 3 fois dans du RPMI et suspendues entre 10×10^6 et 50×10^6 cellules/ml dans du sérum bovin (BS) froid à 10% de dyméthylsulfoxyde (DMSO). Les cellules sont immédiatement mises à -80°C dans des tubes de congélation et transférées dans des réservoirs d'azote le lendemain pour l'entreposage à long terme.

2.2.2 Décongélation des PBMCs et purification des lymphocytes T CD4+

Les PBMCs sont extraites de l'azote et placées dans un bain-marie à 37°C pour environ une minute. Lorsqu'elles sont presque totalement décongelées, elles sont transférées dans

1ml de BS à 37°C, puis du RPMI y sont ajoutées jusqu'à 45ml. La suspension est centrifugée à 1500 rpm pendant 5 minutes, et les cellules sont comptées. Ces dernières sont ensuite centrifugées à 1500rpm pour 5min, puis elles sont resuspendues dans du EasySep™ buffer (Stemcell) à une concentration de 50×10^6 cellules/ml, mais dans un minimum de 1ml. Les cellules sont ensuite enrichies en lymphocytes T CD4+ avec la trousse de sélection négative de CD4 humains de Stemcell, selon les directives du fabricant. La qualité de l'enrichissement est vérifiée grâce à un marquage de pureté par cytométrie en flux.

2.3 Quantification des réservoirs du VIH

2.3.1 Quantification de l'ADN viral

Dans le but de quantifier l'ADN total et intégré du VIH dans les lymphocytes T CD4+, une PCR quantitative ultrasensible a été mise au point au laboratoire. En premier lieu, les PBMCs sont décongelées et enrichies en lymphocytes T CD4+ tel que décrit ci-dessus. Les cellules sont lavées dans du RPMI à 10% de FBS et 5% de pénicilline/streptomycine (R10), comptée, mises en culot secs d'environ 1×10^6 cellules puis entreposées à -80°C. Ensuite, les quantifications de l'ADN total et intégré du VIH sont effectuées (Vandergeeten et al., 2014). En plus de l'ADN viral, le gène codant pour CD3 est également amplifié lors de ces PCR afin de quantifier précisément le nombre de cellules dans chaque puits de PCR (2 copies du gène CD3 par cellule). En premier lieu, les échantillons sont digérés durant environ 14h à 55°C dans un volume approprié de protéinase K à 400µg/ml. L'enzyme est ensuite inactivée durant 5 min à 95°C. Dans une plaque 96 puits, 35µl d'un mélange de préamplification sont ajoutés. Ce dernier est composé d'un tampon pour Taq polymérase à 1X (Invitrogen), de 3mM de MgCl₂, de 300µM de désoxyribonucléotides triphosphates (dNTPs), de 300nM de chaque amorce CD3 (HCD3OUT5' et HCD3OUT3'), de 300nM d'amorces spécifiques à la séquence à amplifier (ULF1 et UR1 pour l'ADN total ou Alu1 et Alu2 pour l'ADN intégré) (Tableau 1), de 2.5U de Taq polymérase (Invitrogen) et d'eau stérile. Pour la PCR de l'ADN intégré, 150nM supplémentaires de l'amorce ULF1 ainsi que 3.75U de Taq sont ajoutés.

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

Tableau 1. Séquence des sondes et des amorces utilisées pour les PCR quantitatives nichées visant à mesurer l'ADN total et intégré du VIH

Ensuite, 15µl des lysats cellulaires sont combinés au mélange de préamplification, à raison de 2 à 3 réplicats par échantillon. Pour chaque plaque, un contrôle négatif de préamplification ainsi que le nombre approprié de puits de standard sont ajoutés. Ces derniers permettent la quantification des échantillons et sont produits à partir de cellules ACH2 lysées à une concentration connue. Huit suspensions de ce produit, allant de 20x10⁶ cellules/ml à 200 cellules/ml, sont obtenues par dilutions sérielles et sont distribuées à raison de 15µl par puits. Les échantillons sont ensuite préamplifiés dans un thermocycleur *ProFlex PCR System* (Applied Biosystem) selon les cycles ci-dessous (Tableau 2).

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

Tableau 2. Conditions de préamplification pour les PCR quantitatives nichées

Pour la PCR quantitative, 6,4µl du produit d'amplification dilué 10X sont combinés à 13,6µl du mix de post-amplification. Ce dernier est composé du mélange prêt à utiliser *ToughMix* (Quantabio) à 1X, de 1250nM des amorces appropriées (HCD3-IN-3' et HCD3-

IN-5' pour le CD3, LambdaT et UR2 pour le VIH ou TREC-IN-F et TREF-IN-R pour les TRECs), de 200nM de la sonde correspondante (CD3, UHIV et TREC, respectivement) et d'eau stérile (Tableau 1). Pour chaque série d'amplification, un contrôle négatif devra être ajouté. La quantification des échantillons est ensuite effectuée dans un RotorGene (Qiagen) selon les cycles ci-dessous (Tableau 3).

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

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

Le nombre de copies d'ADN viral quantifié est rapporté sur le nombre de copies de CD3 contenues dans l'échantillon afin d'obtenir une fréquence. La moyenne des réplicats est utilisée comme valeur finale.

2.3.2 Quantification de l'ARN viral

Dans le but de quantifier l'ARN viral LTR-gag associé aux cellules, une PCR quantitative nichée contenant une étape de rétrotranscription est utilisée. Premièrement, les PBMCs sont décongelées et enrichies en CD4+ tel que décrit ci-dessus. Les cellules sont lavées dans du R10, comptées, mises en culots secs d'environ 1×10^6 cellules puis entreposées à -80°C . Ensuite, l'ADN et l'ARN sont extraits simultanément grâce à la trousse AllPrep DNA/RNA de Qiagen, selon les directives du fabricant (Qiagen). L'ADN extrait peut être utilisé pour réaliser la PCR ADN décrite plus haut, sans changement à la sensibilité de cette dernière. Dans une plaque 96 puits, 16.5µl d'une solution de préamplification sont ajoutés. Ce dernier est composé d'un mélange réactionnel commercial à 1X (Invitrogen), de 500nM de chaque amorce (Tableau 4), de 2µl d'un mélange de Taq comprenant une transcriptase inverse ainsi qu'une polymérase (Invitrogen) et d'eau stérile.

Cible	Étape	Nom de l'amorce ou sonde	Séquence (5' à 3')
ARN LTR-gag	Préamplification	ULF1	ATG CCA CGT AAG CGA AAC TCT GGG TCT CTC TDG TTA GAC
		UR1	CCA TCT CTC TCC TTC TAG C
	PCR quantitative	LambdaT	ATG CCA CGT AAG CGA AAC T CTG AGG GAT CTC TAG TTA CC
		UHIV Taqman	/56-FAM/CA CTC AAG G/ZEN/C AAG CTT TAT TGA GGC /3IABkFQ/
		HCD3IN3'	CCT CTC TTC AGC CAT TTA AGT A
		CD3 Taqman	/56-FAM/AG CAG AGA A/ZEN/C AGT TAA GAG CCT CCA T/3IABkFQ/

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

Ensuite, 8.5µl d'ARN extrait sont combinés au mélange de préamplification, à raison de 2 à 3 réplicats par échantillon. Pour chaque plaque, un contrôle négatif de préamplification ainsi que le nombre approprié de puits de standard sont ajoutés. Ces derniers permettent la quantification des échantillons et sont composés d'ARN de LTR-gag issus de la transcription *in vitro*. Huit dilutions sérielles de ces ARNs, allant de 3x10⁵ copies/8.5µl à 3 copies/8.5µl, sont obtenues par dilutions sérielles et sont distribuées à raison de 8.5µl par puits. Les échantillons sont ensuite préamplifiés dans un thermocycleur *ProFlex PCR System* (Applied Biosystem) selon les cycles ci-dessous (Tableau 5).

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

Tableau 5. Conditions de préamplification pour les PCR quantitatives nichées

Pour la PCR quantitative, 6.4µl du produit d'amplification dilué 10X sont combinés à 13,6µl du mix de post-amplification. Ce dernier est composé du mélange PerfeCTaq PCR ToughMix de Quantabio à 1X (Quantabio), de 1250nM des amorces appropriées, de 100nM de la sonde et d'eau stérile (Tableau 4). Pour chaque série d'amplification, un contrôle négatif est ajouté. La quantification des échantillons est ensuite effectuée dans un RotorGene (Qiagen) selon les cycles ci-dessous (Tableau 6).

Température (°C)	Temps
------------------	-------

Dénaturation	95	4 min	X 45
Cycling	95	3 sec	
	60	10 sec	
Acquisition simple	-	-	

Tableau 6. Conditions d'amplification pour la seconde réaction des PCR quantitatives nichées

Le nombre de copies de LTR-gag est rapporté au nombre de génomes proviraux, mesurés en parallèle. La moyenne des réplicats est utilisée comme valeur finale.

2.3.3 TILDA

La technique TILDA a été mise au point au laboratoire dans le but de mesurer la fréquence de lymphocytes T CD4+ capables de produire des ARNm viraux multiépissés, suite à une stimulation. La quantification de ce réservoir viral inductible se fait grâce à une PCR nichée en dilution limite, tel que précédemment décrit (Procopio et al., 2015). Premièrement, les PBMCs sont décongelées et enrichies tel que décrit ci-haut. Ensuite, elles sont lavées dans du R10 à 1X d'ARV, comptées et resuspendues dans le même milieu à 2×10^6 cellules/ml. Les cellules reposent entre 2h et 6h à 37°C en plaque 24 puits. Elles sont ensuite stimulées par 100ng/ml d'acétate de myristate de phorbol (PMA) et 1µg/ml de ionomycine et incubées pendant 12h à 37°C. La qualité de la stimulation est évaluée par inspection visuelle et grâce à l'expression du marqueur d'activation CD69 mesurée par cytométrie en flux. Les cellules sont lavées 2x au R10 et sont comptées à l'œil. Elles sont ensuite resuspendues à 18×10^6 cellules/ml en tampon phosphate salin (PBS) à 10% de sérum bovin foetal (FBS). Des dilutions sérielles sont également effectuées afin d'avoir les conditions suivantes : 9×10^6 cellules/ml, 3×10^6 cellules/ml et 1×10^6 cellules/ml. Dans une plaque 384 puits, 1µl des suspensions cellulaires sont ajoutés à 5µl de tampon Superscript Platinum contenant du Rox (Invitrogen) ainsi qu'à 5µl d'un mélange de préamplification, à raison de 24 puits par dilution. Ce dernier contient, pour chaque puits, 2.2µl de tampon TE, 0.125µl des amorces de préamplification tat1.4 et Rev à 20µM (Tableau 7), 0.1µl d'inhibiteur de RNase (Ambion), 0.2µl de la Taq polymérase Superscript Platinum III (Invitrogen) et 2,25µl d'eau stérile.

Cible	Étape	Nom de l'amorce ou sonde	Séquence (5' à 3')
-------	-------	--------------------------	--------------------

ARN viraux multiépissés	Préamplification	Tat1.4	TGG CAG GAA GAA GCG GAG A
		Rev	GGA TCT GTC TCT GTC TCT CTC TCC ACC
	PCR quantitative	Tat2	ACA GTC AGA CTC ATC AAG TTT CTC TAT CAA AGC A
		Rev	GGA TCT GTC TCT GTC TCT CTC TCC ACC
	Sonde MSHIV	56-FAM/TTC CTT CGG /ZEN/GCC TGT CGG GTC CC/3IABkFQ	

Tableau 7. Séquences des amorces et de la sonde utilisés pour la PCR nichée TILDA

Pour chaque plaque, un contrôle négatif de préamplification (eau stérile) ainsi que des contrôles positifs sont ajoutés aux concentrations appropriées. Ces derniers sont obtenus grâce à des dilutions sérielles d'ARN extrait de cellules ACH2. La préamplification se déroule ensuite dans un thermocycleur *ProFlex PCR System* (Applied Biosystem) selon les cycles ci-dessous (Tableau 8).

	Température (°C)	Temps
RT	50	15 min
Dénaturation	95	2 min
Cycling	95	15 sec
	60	4 min
Entreposage	12	∞

Tableau 8. Conditions de préamplification pour le TILDA

Suite à la préamplification, 1µl est transféré dans une nouvelle plaque 384 puits contenant 9µl de mélange pour la seconde amplification. Ce dernier se compose, pour chaque puits, de 5µl du mélange prêt à utiliser TaqMan FastAdvance (Applied Biosystems), de 0.2µl des amorces tat2 et Rev2 à 20µM, de 0.2µl de la sonde MSHIV à 5µM (Tableau 7) et de 3.4µl d'eau stérile. La détection de l'échantillon se déroule ensuite dans un QuantStudio 5 (Applied Biosystems) selon les cycles ci-dessous (Tableau 9).

	Température (°C)	Temps
Préincubation	95	2 min
Cycling	95	15 sec
	60	4 min
	12	∞

Tableau 9. Conditions d'amplification pour la seconde PCR TILDA

La fréquence des cellules portant de l'ADN viral compétent pour la réactivation est déterminée par l'approche du rapport de vraisemblance, tel que préalablement décrit (Y. Hu & Smyth, 2009). Grâce au nombre de puits positifs pour une dilution donnée, il est possible de calculer une fréquence des cellules ayant la capacité de produire des ARN tat/rev.

2.3.4 B15-dfQVOA

Les mesures de réservoir précédemment décrites sont rapides, extrêmement sensibles et surtout, demandent peu de cellules. Toutefois, elles ne permettent pas de mesurer le réservoir responsable du rebond viral, c'est-à-dire les provirus intégrés capables de produire des virions infectieux. Le principe du QVOA est d'induire la production et la dissémination en culture de particules virales compétentes pour la réplication via l'activation de lymphocytes T CD4+. Dans le cadre de l'étude clinique hormone de croissance, une version modifiée de cette technique préalablement décrite a été utilisée (Y. Zhang et al., 2020). Selon notre optimisation, la stimulation est faite avec la bryostatine (un agoniste de la voie PKC) ainsi que d'IL-15 et les cellules cibles ne sont pas utilisées, le virus se répliquant dans les CD4+ du donneur ou de la donneuse (autologues). En premier lieu, les PBMCs sont décongelées et enrichies selon le processus décrit plus haut. Les CD4+ sont lavées dans du R10, comptées, resuspendues à 2.5×10^6 cellules/ml dans le même milieu et incubées à 37°C pendant 2h à 6h. Suite à l'incubation, 400µl de la suspension cellulaire sont distribués dans une plaque 24 puits (Costar) à raison de 6 réplicats par échantillon. Des dilutions sérielles en R10 sont également effectuées dans une plaque 96 puits (Costar), de façon à ce que les puits contiennent 200 000 cellules, 100 000 cellules, 50 000 cellules et 25 000 cellules dans un volume total de 125µl. Pour les 3 premières dilutions, 8 réplicats sont effectués par échantillon alors que pour les puits de 25 000 cellules, 16 réplicats sont effectués. Un puits de 200 000 cellules par échantillon est également ajouté en guise de contrôle d'activation. Finalement, 400µl de R10 à 2nM de bryostatine, 200ng/ml d'IL-15 et 200nM d'acide rétinoïque (ATRA) sont ajoutés pour chaque réplikat de la plaque 24 puits et 125µl du même mélange sont ajoutés pour chaque réplikat de la plaque 96 puits. Les échantillons sont ensuite placés dans un incubateur à 37°C.

Après 3 jours de stimulation, la confluence ainsi que l'agglomération des cellules sont notées et un marquage permettant de vérifier la pureté et l'activation est réalisé sur les puits de 200 000 cellules supplémentaires, conformément au protocole décrit ci-dessous. Les cellules sont ensuite transférées dans des plaques 96 puits à fond en V et centrifugées à 1500rpm pendant 5 minutes, lavées 2 fois au R10, puis suspendues dans 200µl du même milieu pour les puits de 1×10^6 cellules et dans 125µl pour les autres. Les dilutions pour lesquelles la majorité des puits montraient des cellules confluentes sont divisées en deux

fois plus de puits de volume égal et du R10 est ajouté afin de combler la différence. Les cellules sont transférées dans des plaques 24 ou 96 puits selon le diagramme ci-dessous (Figure 12). 200µl de R10 sont ajoutés aux puits contenant 1×10^6 cellules. Finalement, 400µl de R10 à 10ng/ml d'IL-2 et 200nM d'ATRA sont ajoutés pour chaque réplicat de la plaque 24 puits et 125µl du même mélange sont ajoutés pour chaque réplicat de la plaque 96 puits. Les échantillons sont ensuite placés dans un incubateur à 37°C.

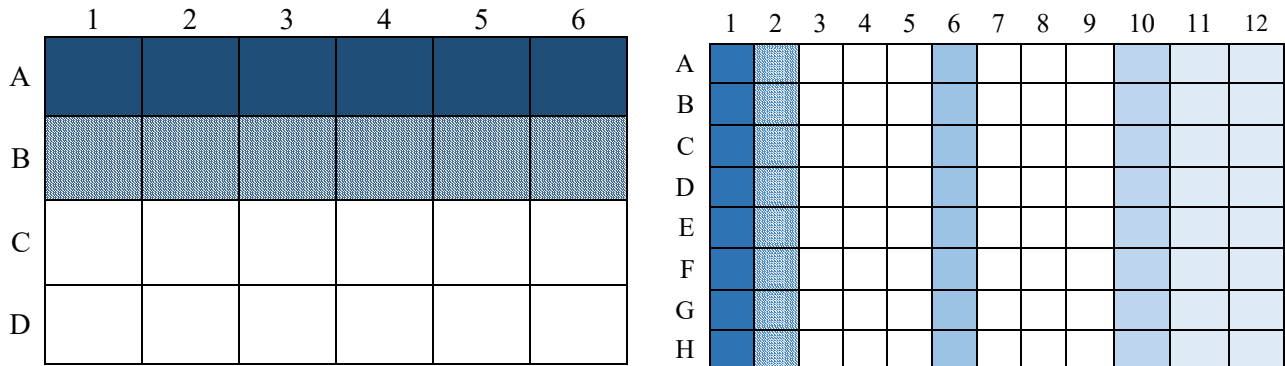


Figure 12. Schéma de mise en culture d'un échantillon en QVOA à jour 3.

Les tons de bleu représentent les différentes dilutions, allant de 1×10^6 à 2.5×10^4 cellules par puits. Les sections hachurées représentent des exemples de puits qui ont été divisés, en raison d'une confluence élevée.

Aux jours 6, 9, 13 et 16, la confluence des cellules est observée au microscope. 125µl et 200µl de surnageant sont prélevés des plaques 96 et 24 puits, respectivement, puis mélangés à du tampon d'inactivation à raison de 25µl de tampon pour 100µl surnageant. Ce dernier est composé de PBS à 0.05% de Tween-20, 2.5% de triton X-100, 0.02% de thimérosal et 1% de bleu de trypan. 200µl supplémentaires de surnageant sont retirés des puits de 1M et les dilutions pour lesquelles la majorité des puits étaient confluents sont divisées en deux fois plus de puits de volume égaux. Finalement, 400µl de R10 à 5ng/ml d'IL-2 et 200nM d'ATRA sont ajoutés pour chaque réplicat de la plaque 24 puits et 125µl du même mélange sont ajoutés pour chaque réplicat de la plaque 96 puits. Les puits qui contenaient encore une importante quantité d'agglomérats cellulaires sont mélangés à la pipette avant d'être à nouveau placés à l'incubateur à 37°C. Lors de la dernière journée (jour 16), les cellules ainsi que le surnageant restant sont ensuite éliminés de façon appropriée.

La quantification de la production virale se fait par détection de la protéine p24 dans les surnageants de culture par ELISA. Tout d'abord, 100µl d'anticorps monoclonal anti-p24 183 H12-5C à 5µg/ml, suspendus dans un tampon constitué de 0.1M de NaHCO₃, de 0.37M de Na₂CO₃ et de 0.02% de Thimérosal, sont ajoutés à une plaque ELISA de 96 puits et sont incubés durant 12h à 4°C. Les plaques sont ensuite lavées 3 fois avec 200µl de PBS à 0.05% Tween-20 (PBST) et séchées. 100µl de tampon de blocage, fait de PBST à 1% d'albumine de sérum bovin (BSA), sont ajoutés à chaque puits et sont incubés pendant 45 minutes à 37°C. Les plaques sont ensuite lavées 3 fois avec 200µl de PBST et séchées. Les échantillons sont dilués 2x dans du tampon de blocage et sont ajoutés à raison de 100µl par puits. Pour chaque plaque, le nombre approprié de puits sont chargés uniquement de tampon de blocage pour faire office de contrôles négatifs. De plus, des dilutions sérielles 2x sont effectuées à partir d'un standard titré, de façon à obtenir 8 puits de standard par plaque, allant de 320pg/ml à 2.5pg/ml de p24. Les plaques sont incubées pendant une heure à 37°C, puis elles sont lavées 4 fois avec 200µl de PBST et séchées. Ensuite, 100µl d'anticorps biotinylé dilué à 1/2500 sont ajoutés à chaque puits et sont incubés durant 45 min à 37°C. Les plaques sont lavées 4 fois avec 200µl de PBST et séchées, puis 100µl de streptavidine HRP40 diluée à 1/10000 sont ajoutés à chaque puits. Les plaques sont incubées durant 30 min à température pièce, lavées 4 fois avec 200µl de PBST puis séchées. Pour révéler la présence de protéine p24, 100µl de substrat TMB sont ajoutés à chaque puits et les plaques sont incubées à température pièce et protégées de la lumière. Lorsqu'un changement de couleur apparent s'effectue dans les plus basses dilutions du standard, 50µl de solution d'arrêt, composée de H₃PO₄ à 1M, sont ajoutés aux puits. La protéine p24 est quantifiée par un lecteur de plaque grâce à une lecture à 450nm et une autre à 690nm. Afin de déterminer la fréquence des cellules portant un génome viral compétent pour la réplication, le maximum de vraisemblance est estimé tel que précédemment décrit (Rosenbloom et al., 2015). Cette méthode prend en considération le nombre de puits positifs pour une dilution donnée et permet de calculer la fréquence des cellules T CD4+ portant des virus compétents pour la réplication.

2.4 Quantification des TRECs

Dans le but de quantifier la production thymique, une PCR quantitative ultrasensible a été mise au point pour détecter le nombre de copies de TRECs dans les lymphocytes T CD4+. Les PBMCs sont décongelées et enrichies en CD4+ tel que décrit ci-dessus. Les cellules sont lavées dans du R10, comptées, mises en culots secs d'environ 1×10^6 cellules puis entreposées à -80°C . Les cellules sont digérées pendant 14h à 55°C dans un volume approprié de protéinase K à $400\mu\text{g/ml}$. L'enzyme est ensuite inactivée durant 5 min à 95°C . Dans une plaque 96 puits, $35\mu\text{l}$ d'un mélange de préamplification sont ajoutés. Ce dernier est composé d'un tampon pour Taq polymérase à 1X (Invitrogen), de 3mM de MgCl_2 , de $300\mu\text{M}$ de dNTPs, de 300nM de chaque amorce CD3 (HCD3OUT5' et HCD3OUT3'), de 300nM d'amorces spécifiques à la séquence à amplifier (TREC-IN-F et TREC-IN-R) (Tableau 10), de 2.5U de Taq polymérase (Invitrogen) et d'eau stérile.

Cible	Étape	Nom de l'amorce ou sonde	Séquence (5' à 3')
sjTRECs	Préamplification	TREC-OUT-F	TCT CTC CTA TCT CTG CTC TG
		TREC-OUT-R	CTG ACA TTT GCT CCG TGG TC
	PCR quantitative	TREC-IN-F	GGC AGA AAG AGG GCA GCC
TREC-IN-R		GTG CTG GCA TCA GAG TGT GT	
CD3	Préamplification	TREC TaqMan	CAC GGT GAT GCA TAG GCA CCT GC
		HCD3OUT5'	ACT GAC ATG GAA CAG GGG AAG
	HCD3OUT3'	CCA GCT CTG AAG TAG GGA ACA TAT	
	PCR quantitative	HCD3IN5'	GGC TAT CAT TCT TCT TCA AGG T
		HCD3IN3'	CCT CTC TTC AGC CAT TTA AGT A
CD3 Taqman		/56-FAM/AG CAG AGA A/ZEN/C AGT TAA GAG CCT CCA T/3IABkFQ/	

Tableau 10. Séquence des sondes ou des amorces utilisées pour la PCR quantitative nichée TREC.

Par la suite, $15\mu\text{l}$ des lysats cellulaires sont combinés au mélange de préamplification, à raison de 2 à 3 réplicats par échantillon. Pour chaque plaque, un contrôle négatif de préamplification ainsi que le nombre approprié de puits de standard sont ajoutés. Ces derniers sont constitués d'un plasmide de concentration connue dans lequel le gène CD3 et la section *joint-signal* des cercles d'excision des récepteurs T ont été clonés. Les échantillons sont ensuite préamplifiés dans un thermocycleur *ProFlex PCR System* (Applied Biosystem) selon les cycles ci-dessous (Tableau 11).

Température ($^\circ\text{C}$)	Temps
----------------------------------	-------

Dénaturation	95	8 min
Cycling	95	30 sec
	55	30 sec
	72	1 min
Élongation	72	5 min
Entreposage	4	∞

Tableau 11. Conditions de préamplification pour la quantification des TRECs

Pour la PCR quantitative, 6,4µl du produit d'amplification dilué 10X sont combinés à 13,6µl du mix de post-amplification. Ce dernier est composé du mélange prêt à utiliser *ToughMix* (Quantabio) à 1X, de 1250nM des amorces appropriées (HCD3-IN-3' et HCD3-IN-5' pour le CD3 ou TREC-IN-F et TREF-IN-R pour les TRECs), de 200nM de la sonde correspondante (CD3 et TREC, respectivement) et d'eau stérile (Tableau 10). Pour chaque série d'amplification, un contrôle négatif devra être ajouté. La quantification des échantillons est ensuite effectuée dans un Rotor-Gene (Qiagen) selon les cycles ci-dessous (Tableau 12) et l'analyse est réalisée grâce au logiciel Rotor-Gene™ Q (Qiagen).

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

Tableau 12. Conditions d'amplification pour la quantification des TRECs

Le nombre de copies de TREC quantifié est rapporté au nombre de copies de CD3 contenues dans l'échantillon afin d'obtenir une fréquence. La moyenne des réplicats est utilisée comme valeur finale.

2.5 Séquençage de la boucle V3

2.5.1 Amplification de la boucle V3 de l'enveloppe virale

Dans le but de prédire le corécepteur (CCR5 ou CXCR4) utilisé par le variant viral majoritaire, le gène codant pour la boucle V3 de la protéine d'enveloppe gp120 a été amplifié par PCR. Les PBMCs sont décongelées et enrichies en CD4+ tel que décrit ci-dessus. Les cellules sont lavées dans du R10, comptées, mises en culots secs d'environ 1x10⁶ cellules puis entreposées à -80°C. Les échantillons sont digérés pendant 14h à 55°C dans un volume approprié de protéinase K à 400µg/ml. L'enzyme est ensuite inactivée pendant 5 min à 95°C. Dans une plaque 96 puits, 40µl d'un mélange de préamplification

sont ajoutés. Ce dernier est composé de DMSO à 3%, de 10µM de chaque amorce spécifique à la PCR1 (V3F et V3R, Tableau 13), de Master Mix Phusion™ (Thermo Fisher), contenant une enzyme à haute fidélité, à 1X et d'eau stérile.

Étape	Nom de l'amorce	Orientation	Séquence (5' à 3')
PCR1	V3F	Sens	GGCTTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAG
	V3R	Anti-sens	GGTCTTAAAGGTACCTGAGGTCTGACTGGA
PCR2	Env7	Sens	AATGGCAGTCTAGCAGAAG
	ED33	Anti-sens	TTACAGTAGAAAAATCCCCTC

Tableau 13. Séquence des amorces utilisées pour la PCR d'amplification de la boucle V3.

Ensuite, 10µl des lysats cellulaires sont combinés au mélange de préamplification. Pour chaque plaque, un contrôle négatif et positif de préamplification sont ajoutés. La préamplification est effectuée dans un thermocycleur *ProFlex PCR System* (Applied Biosystem) selon les cycles ci-dessous (Tableau 14).

	Température (°C)	Temps
Dénaturation	98	2 min
Cycling	98	30 sec
	63	30 sec
	72	4 min + 5 sec/cycle
Élongation	72	10 min
Entreposage	4	∞

Tableau 14. Conditions de préamplification pour la boucle V3.

Pour la seconde PCR, 5µl du produit d'amplification, dilué 10X, sont combinés à 45µl du second mélange d'amplification. Ce dernier est identique au premier, mais contient des amorces différentes (Env7 et ED33, Tableau 13). De plus, la seconde amplification est également effectuée dans un thermocycleur *ProFlex PCR System* (Applied Biosystem) selon les cycles ci-dessous (Tableau 15). Afin de vérifier si l'amplicon obtenu est bien de la longueur attendue, soit de 373 pb, les produits de PCR sont observés sur gel d'agarose à 2%.

	Température (°C)	Temps
Dénaturation	98	2 min
Cycling	98	30 sec
	53	30 sec
	72	1 min 30 sec
Élongation	72	10 min
Entreposage	4	∞

Tableau 15. Conditions d'amplification pour la seconde réaction des PCR de la boucle V3

2.5.2 Séquençage de la boucle V3 et détermination de l'usage du corécepteur

Les amplicons sont purifiés en plaque 96 puits par le kit PCR QIAquick (Qiagen) et la pureté du produit final est déterminée grâce au spectrophotomètre NanoDrop (Thermo Fisher). Les échantillons sont ensuite envoyés à Eurofins Genomics afin d'être séquencés par la méthode Sanger et le résultat est analysé avec le logiciel Geneious. L'utilisation du corécepteur par le variant majoritaire est finalement déterminée par un l'algorithme geno2pheno dont le seuil de fausse positivité est fixé à 10% (Lengauer, Sander, Sierra, Thielen, & Kaiser, 2007).

2.6 Analyses phénotypiques par cytométrie en flux

2.6.1 Pureté et activation

Afin d'évaluer la pureté des LT CD4⁺ purifiés et l'efficacité de l'activation dans les tests d'induction, jusqu'à 5×10^5 cellules CD4 sont distribuées dans une plaque 96 puits à fond en V. Les cellules sont centrifugées à 1800rpm pendant 3 minutes, puis les culots sont resuspendus dans 20 μ l d'un mélange en PBS à 4% de FBS contenant les anticorps suivants : CD3-A700 (BD #557943), CD4-AP (BD #555349), CD8-PerCPCy5.5 (BD #341051), CD14-3V450 (BD #560349), CD69-Pe-Cy7 (BioLegend #310912) et Live/Dead-Aqua (Thermo Fisher #L34965). Les cellules sont incubées pendant 20 à 30 minutes à 4°C, puis 160 μ l de PBS à 4% de FBS sont ajoutés. Les plaques sont centrifugées durant 3 min à 1800 rpm, puis les cellules sont resuspendues dans 100 μ l de PBS à 4% de FBS et à 2% de paraformaldéhyde et transférées dans des tubes adéquats. L'acquisition se fait dans un cytomètre de flux LSR II (BD biosciences) muni du logiciel d'analyse FACSdiva™ (BD biosciences). Les analyses subséquentes sont faites grâce au logiciel d'analyse FlowJo™ (BD biosciences).

2.6.2 Phénotypage des PBMCs

Afin de réaliser l'analyse phénotypique des LT CD4⁺ (marqueurs mémoires, d'activation, de prolifération et de sénescence), 5×10^5 à 1×10^6 cellules par échantillon sont distribuées dans une plaque 96 puits à fond en V. Les cellules sont ensuite centrifugées à 1800rpm

pendant 3 minutes, puis les culots sont resuspendus dans 20µl d'un mélange en PBS à 4% de FBS contenant les anticorps suivants : CD8-BUV395 (BD # 563795), CD3-AF700 (BD #557943), PD-1-BUV737 (BD #565299), CD95-PE-Cy7 (BD #561633), CD27-APCeF780 (eBioscience #47-0279-42), CD45RA-BV786 (BD #563870), CD57-APC (BD #560845), Live/Dead-Aqua (Thermo Fisher #L34965), HLA-DR-PerCP-Cy5.5 (BD #339194), CD31-BV421 (BD #564089), CD58-BV605 (BD #564362), CD4-BUV496 (BD #564651), CCR7-PE-CF594 (BD #562381) et CD38-PE (BD #555460). Pour permettre la compensation des fluorochromes lors de l'acquisition au cytomètre, des contrôles de compensation sont prévus. Ainsi, un volume approprié pour chaque anticorps est ajouté à 20µl de PBMCs d'un donneur sain à 50x10⁶ cellules/ml en PBS à 4% de FBS. Pour la compensation du marqueur live/dead, la mort des PBMCs est induite par un passage à 65°C durant 3 minutes. De plus, pour certains marqueurs moins exprimés, les compensations sont effectuées en utilisant des anticorps portant le fluorochrome adéquat, mais lié à des anticorps spécifiques de molécules davantage exprimées. Pour les marqueurs Ki67, HLA-DR, PD-1 et CD58, les anticorps suivants sont donc utilisés pour la compensation : CD3-FITC (BD #555339), CD8-PerCP-Cy5.5 (BD #341051), CD45RA-BUV737 (BD #564442) et CD4-BV605 (Biolegend #317438), respectivement. Les cellules sont incubées à l'abri de la lumière pendant 30 minutes à 4°C. Ensuite, 150µl de PBS à 4% de FBS sont ajoutés à chaque puits et les cellules sont centrifugées à 1800rpm pendant 3 min. Les culots sont resuspendus dans 200µl de tampon Fix/Perm (Invitrogen #005123) à 1X dans son diluant (Invitrogen #005223) et sont incubés pendant 30 min à 37°C. Les cellules sont ensuite centrifugées à 1800rpm pendant 3 min, lavées une fois dans du tampon Perm FOXP3 1x (Invitrogen #008333) et resuspendues dans 50µl de la même solution. L'anticorps intracellulaire Ki67-FITC (BD #556026) est ajouté aux échantillons, puis les cellules sont centrifugées durant 3 min à 1800rpm et lavées 2 fois dans du tampon perm FOXP3 1x. Finalement, les cellules sont mises en suspension dans 100µl de PBS, transférées dans des tubes adéquats et analysées dans un cytomètre de flux LSR II (BD biosciences) muni du logiciel d'analyse FACSdiva™ (BD biosciences). Les analyses subséquentes sont faites grâce au logiciel d'analyse FlowJo™ (BD biosciences) (Figure 13).

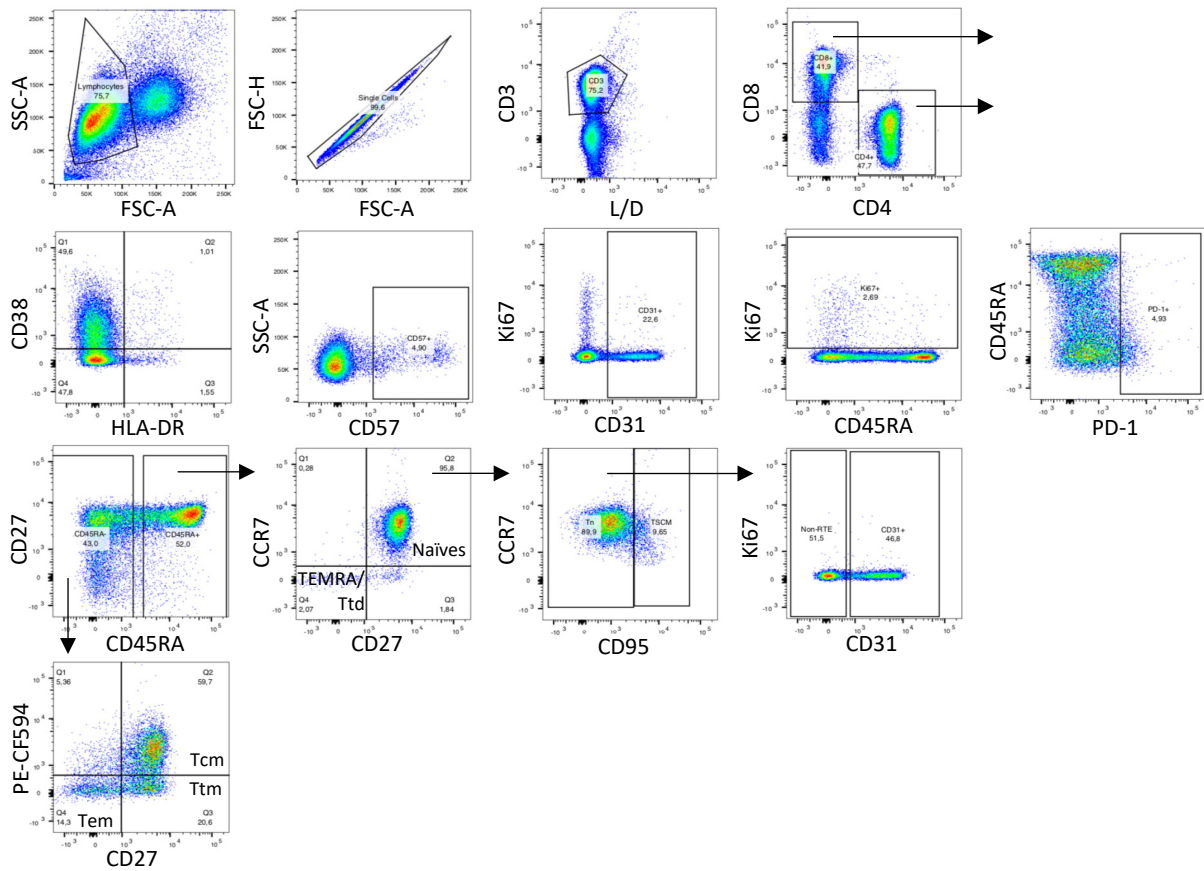


Figure 13. Stratégie d'identification des sous-populations cellulaires et des marqueurs phénotypiques

2.7 Analyses statistiques

La plupart des figures et des analyses statistiques ont été effectuées avec GraphPad Prism 8 (GraphPad software, San Diego, CA). Pour tous les tests statistiques, les valeurs p inférieures ou égales à 0.05 sont considérées comme significatives. Premièrement, le test de Mann-Whitney a été utilisé pour déterminer s'il y avait une différence entre deux groupes donnés pour une variable étudiée. Ensuite, pour évaluer la différence entre plus de deux groupes, la comparaison multiple de Dunn a été utilisée comme test post-hoc au test de Friedman, dans le cas de données appariées, ou de Kruskal-Wallis, lorsque certaines données étaient manquantes. De plus, le test de classement de rang pour paires appariées de Wilcoxon a été utilisé pour étudier la variation d'une valeur entre deux points de suivi des mêmes participants. Finalement, toutes les corrélations ont été effectuées avec la corrélation de Spearman. Afin d'illustrer une grande quantité de corrélation, une matrice a

été créée avec R (<https://cran.r-project.org>). Ce logiciel a également été utilisé pour réaliser des analyses multiparamétriques afin d'identifier les facteurs pouvant influencer l'association entre les marqueurs du réservoir viral et la présence de plaques d'athéroscléroses. Premièrement, nous avons utilisé des modèles de régression logistique univariés et multivariés afin d'étudier l'association entre la présence de plaques et (1) l'ADN total ou (2) l'ADN intégré lorsque les marqueurs du réservoir sont étudiés seuls ou en présence de certaines variables identifiées comme susceptibles d'être confondantes. Ces dernières sont des facteurs de risques traditionnels pour le développement de maladies cardiovasculaires ainsi que des facteurs associés au VIH connus pour influencer le niveau d'inflammation (âge, compte CD4, score de Framingham, durée de l'infection et durée de l'infection non traitée). Deuxièmement, nous avons confirmé les résultats obtenus grâce à la fonction ANOVA et au test chi-carré. Nous avons comparé le modèle à une variable (avec l'ADN viral total ou intégré) au modèle à deux variables (avec chaque marqueur de réservoir plus un autre facteur) afin d'étudier l'impact des différents facteurs sur la performance du modèle de prédiction. Finalement, nous avons utilisé un modèle de régression multiple régularisé de type LASSO (glmnet) afin d'identifier, parmi toutes les données cliniques recueillies (10 au total), le meilleur modèle de prédiction de la présence de plaques d'athéroscléroses et d'en évaluer la précision (1) sans les mesures du réservoir viral, (2) avec l'ADN total et (3) avec l'ADN intégré.

Chapitre 3 : Résultats

3.1 Étude transversale sur l'association entre les facteurs liés au vieillissement et le réservoir viral

3.1.1 Données cliniques de l'étude

Dans le but d'évaluer la relation entre le vieillissement et la persistance du VIH, nous avons réalisé une étude transversale utilisant des échantillons de 88 individus âgés de 21 à 71,8 ans. Lorsqu'on compare les individus plus jeunes (≤ 40 ans) avec ceux se trouvant dans le 3^e quartile (≥ 58 ans), on observe qu'ils sont infectés depuis moins longtemps et à un plus jeune âge ($p < 0.0001$). De plus, la thérapie antirétrovirale n'a pas été initiée plus rapidement chez ce groupe ($p = 0.2830$) et les individus plus jeunes étaient sous traitement depuis moins longtemps au moment de l'analyse ($p < 0.0001$). Il est intéressant de noter que 14 individus appartenant au groupe plus âgé ont initié leur traitement en 1997 ou plus tôt, soit avant l'ère de la TAR hautement efficace, comparativement à 2 individus pour le groupe plus jeune. Finalement, le compte CD4 est similaire chez les deux groupes étudiés (Tableau 16). Dans cette étude, seulement 4 femmes ont été incluses, dont 2 se retrouvent dans le groupe des individus plus jeunes. Le sexe n'a pas été inclus dans les analyses subséquentes, puisque l'effectif est négligeable.

Variables	Total (min – max)	Jeunes (min – max)	Âgés (min – max)	Valeur P
n	88	19	28	-
Âge	51.8 (21 – 71.8)	33 (21 – 40.1)	61.1 (58 – 71.8)	<0.001
Durée de l'infection par le VIH	14.2 (4 – 29.3)	7.6 (4 – 14.2)	20.3 (4.7 – 29)	<0.001
Âge à l'infection	34.9 (16.7 – 56.7)	24.2 (16.7 – 33.6)	42 (32 – 56.7)	<0.001
Durée de la TAR	10.6 (3.3 – 26.3)	6 (3.5 – 9.2)	16,2 (3.3 – 26,3)	<0.001
Âge à l'initiation de la TAR	39.5 (16.9 – 58.8)	26.9 (16.9 – 36.1)	48 (35.6 – 58.8)	<0.001
Date d'initiation	Juin 1999 (oct. 88 – juil. 2014)	Oct. 2010 (mars 96 – juil. 2014)	Juin 97 (avr. 89 – août 2012)	-
Durée de l'infection non traitée	1.6 (0 – 15.1)	1 (0 – 10.2)	1.9 (0 – 14)	0.283
Compte CD4	646 (112 – 1897)	712 (248 – 1589)	602 (378 – 1107)	0.319
Compte CD8	792 (322 – 2128)	740 (322 – 1577)	780 (349 – 1452)	0.850
Ratio CD4/CD8	0.94 (0.25 – 2.37)	1 (0.38 – 2.09)	0.92 (0.26 – 2.37)	0.397

Tableau 16. Données cliniques des participants à l'étude sur l'impact du vieillissement

La médiane ainsi que les valeurs maximales et minimales sont représentées. Les données des participants jeunes (≤ 40 ans) et âgés (≥ 58 ans) ont été comparées par le test de Mann-Whitney.

La taille du réservoir a été déterminée par quantification de différents marqueurs de persistance virale; l'ADN viral total et intégré ainsi que la fréquence des cellules produisant de l'ARN viral multiépissé suite à une stimulation de 12h à la PMA/ionomycine (TILDA) ont été quantifiés. Les échantillons de tous les participants présentaient des niveaux d'ADN quantifiables, mais pour deux individus, aucune cellule produisant des ARN suite à la stimulation de 12h n'a été détectée. Comme attendu, on observe une variation de la taille du réservoir en fonction des individus ainsi que de la méthode utilisée (IQR : ADN total; 222–1567, ADN intégré; 100–738, TILDA; 6–29). Par exemple, la taille du réservoir du VIH est environ 60 fois plus grande par la méthode de l'ADN total en comparaison avec le TILDA (Figure 14).

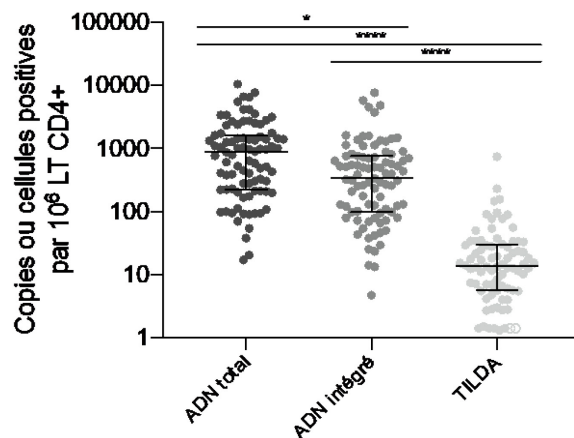


Figure 14. Taille du réservoir du VIH mesuré par différentes méthodes.

La médiane ainsi que l'écart interquartile sont représentés. Les cercles vides représentent la limite de détection des échantillons non quantifiables. Les données ont été analysées avec la comparaison multiple de Dunn. * $p \leq 0.05$, **** $p \leq 0.0001$.

3.1.2 Impact du vieillissement sur la taille du réservoir du VIH

Lorsqu'on compare la taille du réservoir des individus de 40 ans et moins à celle des participants de 58 ans et plus, on observe que les niveaux d'ADN total et intégré sont similaires ($p=0.3081$ et 0.3552 , respectivement) (Figure 15, A et B). Toutefois, le réservoir inductible mesuré par TILDA est significativement plus important chez les individus plus âgés ($p=0,0005$) (Figure 15, C).

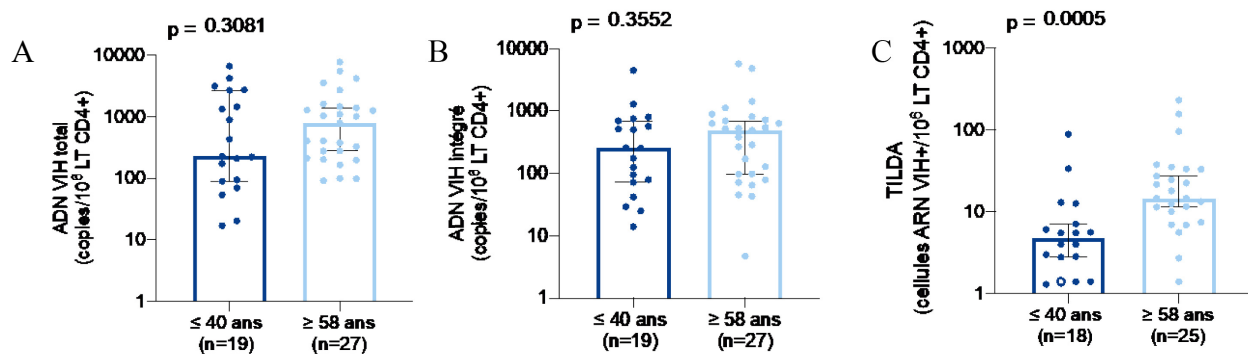


Figure 15. Taille du réservoir viral par différentes méthodes de quantification selon le groupe d'âge des participants.

(A) Mesure de l'ADN viral total chez des personnes jeunes et plus âgées ($n=19$; 27). (B) Mesure de l'ADN viral intégré au génome cellulaire chez des personnes jeunes et plus âgées ($n=19$; 27). (C) Fréquence des cellules produisant les ARN viraux multiépissés Tat et Rev chez les personnes jeunes et plus âgées ($n=18$; 25). Les cercles vides représentent la limite de détection des échantillons non quantifiables. La médiane ainsi que l'intervalle de confiance sont représentées. Les données ont été analysées avec le test de Mann-Whitney.

Lorsque la relation entre la taille du réservoir et le vieillissement est étudiée sur l'ensemble des individus, on observe que la fréquence des cellules produisant de l'ARN mesurée par TILDA est positivement corrélée à l'âge des participants ($p=0.0015$) (Figure 16). Cette association n'est toutefois pas observée pour les mesures d'ADN viral (données non représentées).

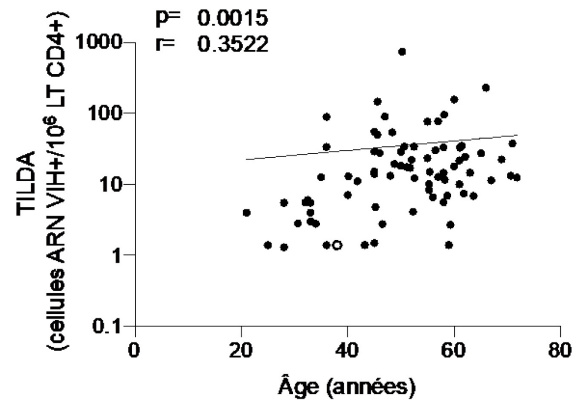


Figure 16. Taille du réservoir inducible selon l'âge des participants (n=79).

La taille du réservoir inducible est déterminée par TILDA et exprimée par la fréquence des cellules produisant les ARN viraux multi épissés Tat et Rev. Les cercles vides représentent la limite de détection des échantillons non quantifiables. Les données ont été analysées par la corrélation de Spearman.

3.1.3 Évolution de la production thymique avec l'âge

La production thymique étant étroitement associée à l'âge ainsi qu'à l'homéostasie lymphocytaire, son étude est particulièrement intéressante dans le contexte de ce projet visant à étudier le lien entre le réservoir viral et le vieillissement. Nous avons quantifié les TRECs dans les LT CD4+ par qPCR ainsi que la fréquence des émigrants thymiques récents dans les LT CD4+ par cytométrie en flux (CD45RA+, CD27+, CCR7+, CD95-, CD31+). La fréquence de LT CD4+ et CD8+ naïfs a également été déterminée par cette méthode (CD45RA+, CD27+, CCR7+, CD95-). Nous observons que la fréquence des TRECs et des LT CD4+ RTE diminue significativement avec l'âge ($p=0.0002$ et 0.0477 respectivement). De plus, bien que la fréquence des LT CD4+ naïfs demeure stable ($p=0.2939$), la fréquence des LT CD8+ naïfs diminue de façon importante avec l'âge ($p<0.0001$) (Figure 17).

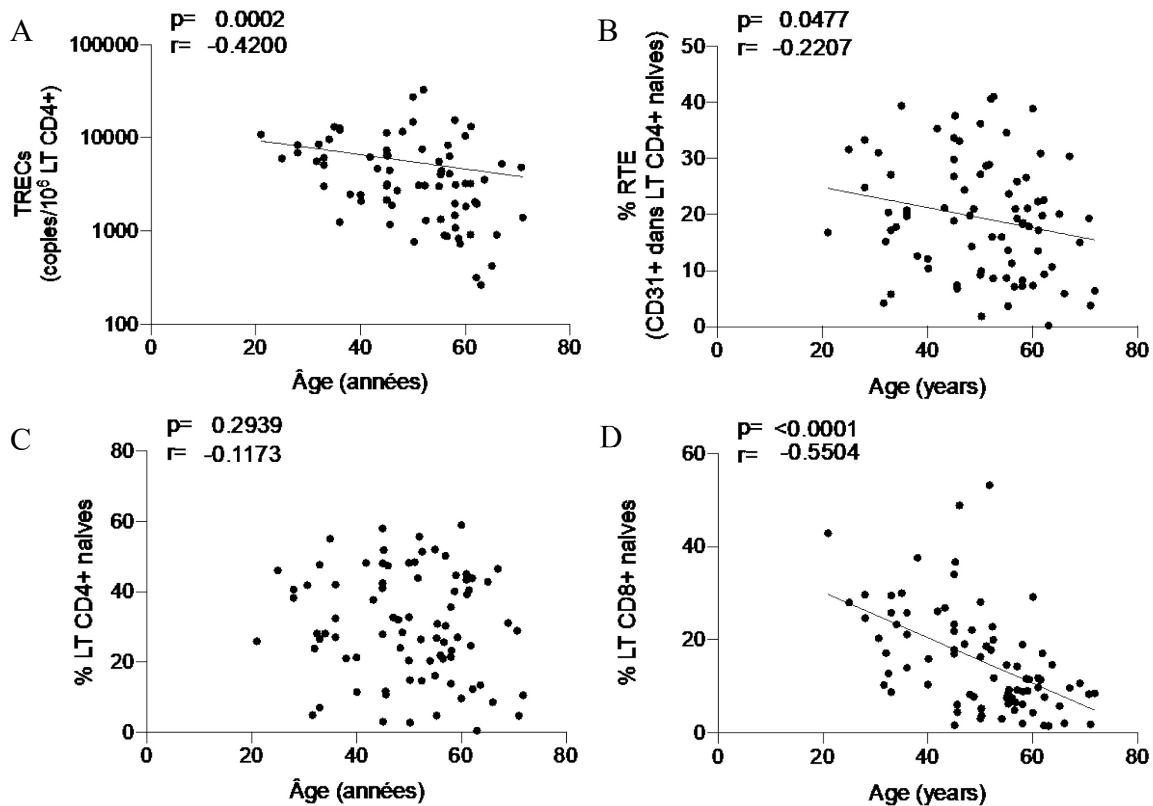


Figure 17. Activité thymique mesurée par différents marqueurs selon l'âge des individus.

(A) Mesure des TRECs dans les LT CD4+ en fonction de l'âge (n=73). (B) Fréquence des RTE dans les LT CD4+ naïfs, telle que déterminée par l'expression de CD31, en fonction de l'âge (n=81). (C) Fréquence des LT CD4+ naïfs en fonction de l'âge (n=82). (D) Fréquence des LT CD8+ naïfs en fonction de l'âge (n=82). Les données ont été analysées par la corrélation de Spearman.

3.1.4 Association entre la persistance virale et plusieurs marqueurs liés à l'âge

Nous avons réalisé une étude phénotypique des lymphocytes T afin d'identifier des perturbations dans les proportions de sous-populations cellulaires qui pourraient expliquer la relation entre l'âge et la taille du réservoir du VIH. Nous avons observé de grandes variations dans les fréquences des sous-populations d'intérêt. Comme attendu, au sein des LT CD4+, on note une grande proportion de naïves (Tn) et de centrales mémoires (Tcm), ainsi qu'une faible proportion de transitionnelles mémoires (Ttm) et de cellules différenciées de façon terminale (Ttd) (Figure 18, A). Pour les LT CD8+, on observe que

les différents sous-types sont présents en proportions similaires, sauf pour les TSCM qui présentent une faible fréquence des LT CD8+ circulants (Figure 18, B).

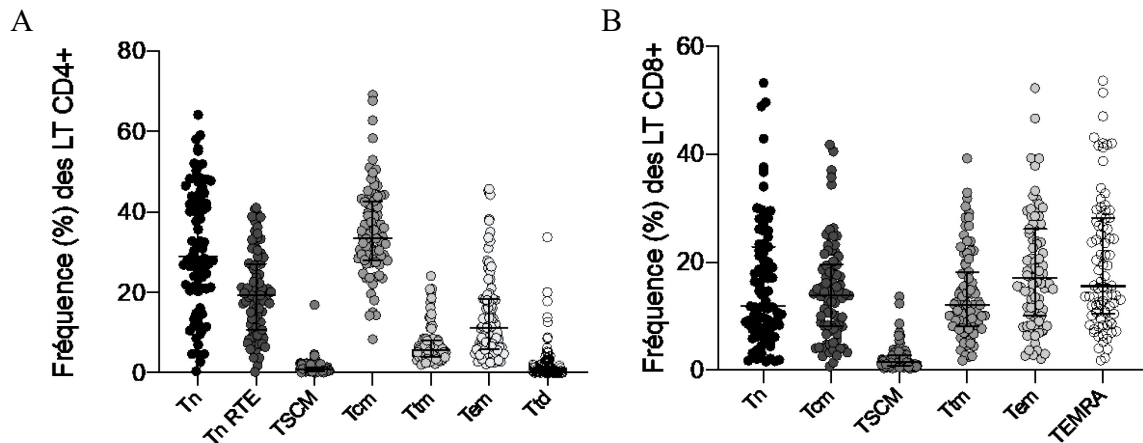


Figure 18. Fréquence des différents sous-types de lymphocytes.

Fréquence des sous-populations de (A) LT CD4+ et (B) LT CD8+, mesurées par cytométrie en flux. La médiane ainsi que l'écart interquartile sont représentés.

Afin d'identifier des facteurs permettant d'expliquer l'association entre le vieillissement et la taille du réservoir du VIH, les marqueurs de réservoirs du VIH ont été mis en relation avec plusieurs facteurs associés à l'âge, dont certaines données de nature clinique, l'importance de la production thymique et la fréquence des différentes sous populations lymphocytaires. Afin de représenter la complexité des interactions entre les données recueillies, ces dernières sont montrées dans une matrice de corrélation à la Figure 19.

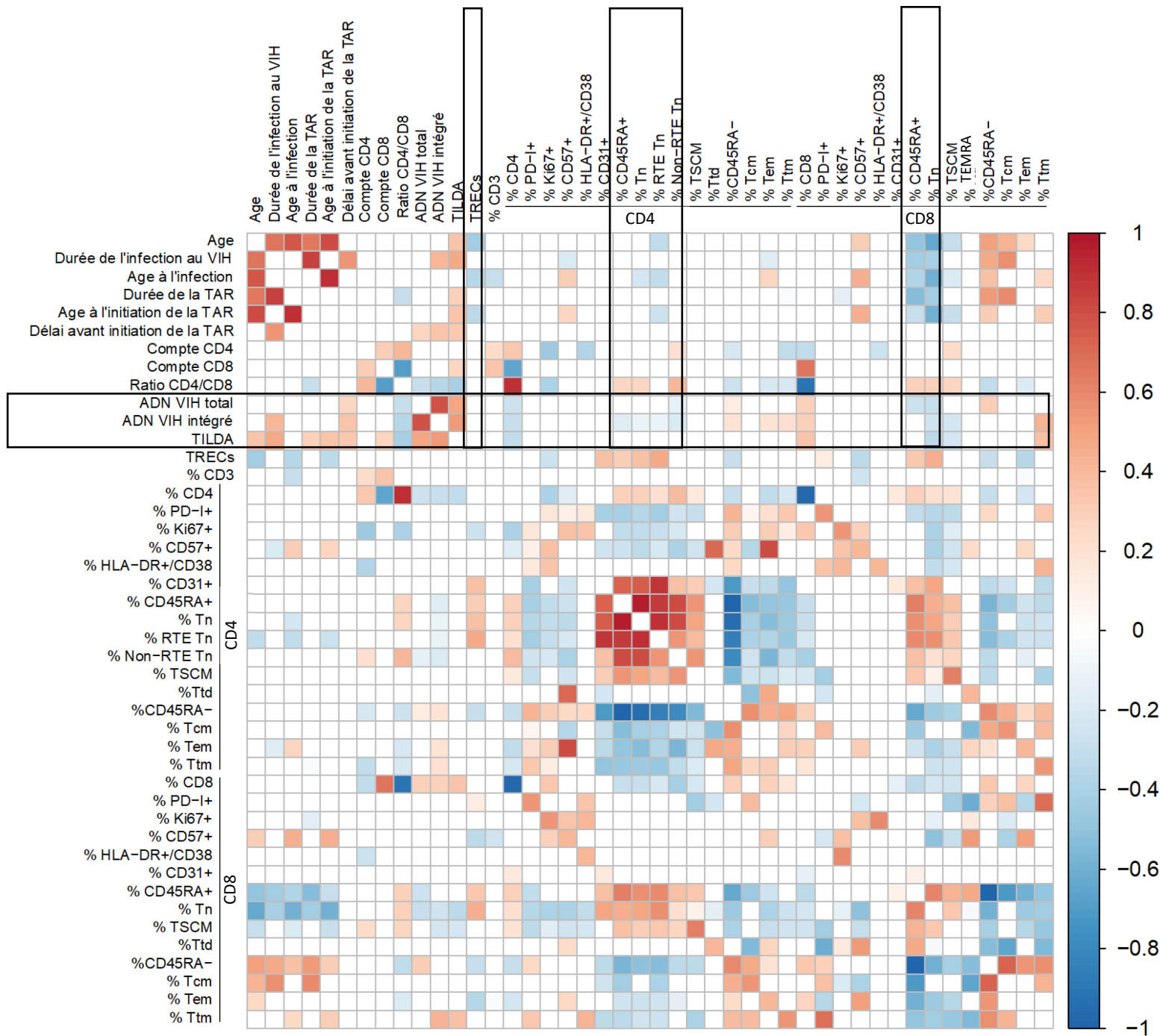


Figure 19. Matrice de corrélation des marqueurs de persistance virale et des variables étudiées.

Les données ont été analysées par la corrélation de Spearman. Seuls les coefficients des associations significatives, soit celles dont $p \leq 0.05$, sont indiqués. Les cases rouges représentent des associations positives et les bleues, des associations négatives. L'intensité de la couleur représente la force de l'association.

Bien que les Tn RTE soient le seul sous-type de LT CD4+ qui varie en fonction de l'âge ($p=0.0409$), plusieurs sous-types de LT CD8+ sont influencés par le vieillissement. On observe que les fréquences de Tn RTE et les TSCM diminuent avec l'âge ($p<0.0001$ et $p=0.0044$, respectivement). En revanche, les fréquences de Tcm et d'effectrices mémoires (Tem) sont positivement associées au vieillissement ($p=0.0023$ et 0.03723 , respectivement) (Figure 19).

Les niveaux d'ADN intégré sont négativement corrélés à la fréquence des LT CD4+ naïfs ($p=0.0345$) (Figure 20, A). En effet, cette mesure de la persistance virale diminue lorsque la production thymique de LT CD4+, évaluée par la fréquence des RTE dans les LT CD4+, est plus importante ($p=0.0199$) (Figure 20, B). Toutefois, cette association n'est pas observée lorsque la production thymique de LT CD4+ est évaluée par la fréquence des TRECs ($p=0.4687$) (Figure 20 C).

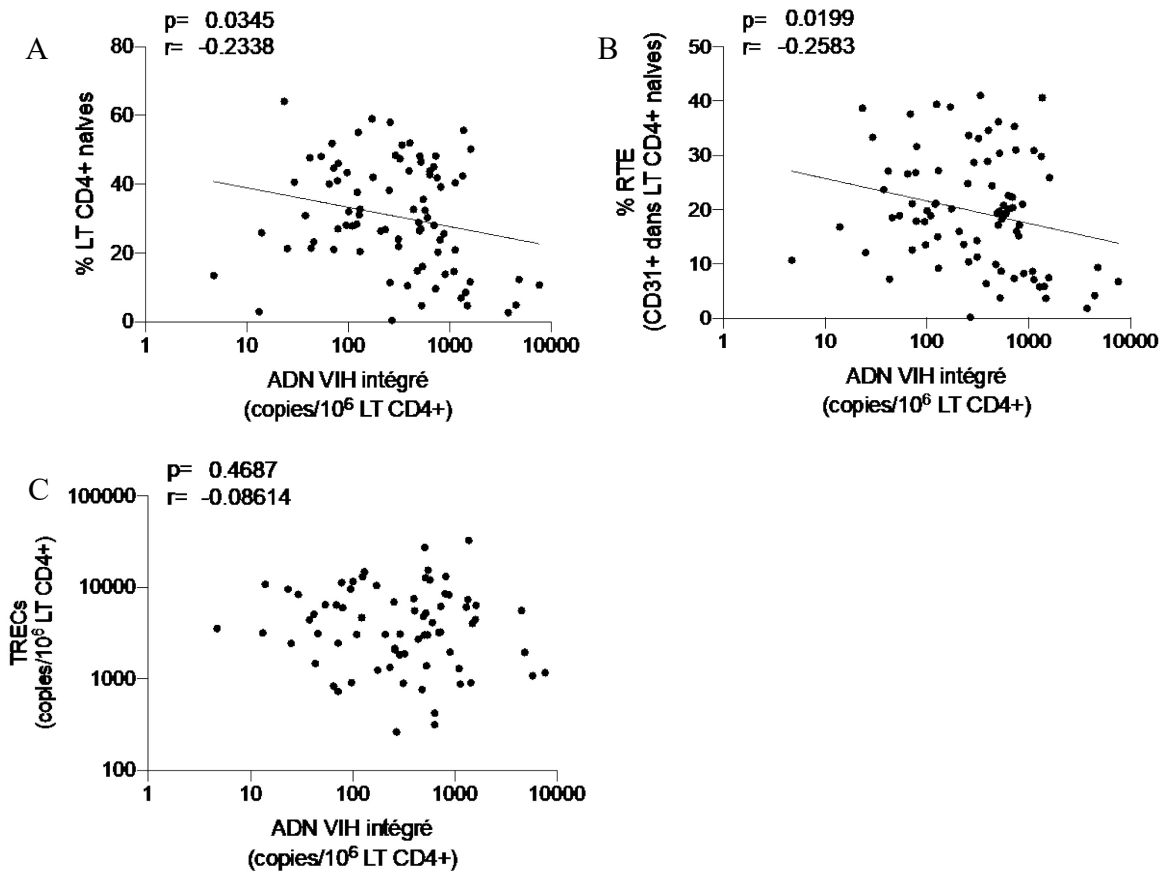


Figure 20. Corrélation entre l'ADN viral intégré ainsi que les marqueurs de la production thymique chez les LT CD4+.

(A) Mesure de l'ADN du VIH intégré en fonction de la fréquence des LT CD4+ naïfs mesurée par cytométrie en flux (n=82). (B) Mesure de l'ADN du VIH intégré en fonction de la fréquence des LT CD4+ RTE mesurée par l'expression de CD31 dans les LT CD4+ naïfs (n=81). (C) Mesure de l'ADN du VIH intégré en fonction de la fréquence la fréquence des TRECs dans les LT CD4+ totaux mesurée par qPCR (n=73). Les données ont été analysées par la corrélation de Spearman.

De plus, on observe que la fréquence des LT CD8+ naïfs corrèle négativement avec toutes les mesures de réservoirs réalisées. En effet, l'association entre la fréquence des LT CD8+ naïfs et l'ADN total ainsi qu'intégré est significative (p=0.0260 et p=0.0079, respectivement) (Figure 21, A et B). Cette association est encore plus importante lorsque la fréquence des cellules produisant de l'ARN viral inducible est mesurée (p=0.0005) (Figure 21, C). Les mesures de réservoir ne sont pas associées aux autres sous-populations de LT CD8+ (Figure 18).

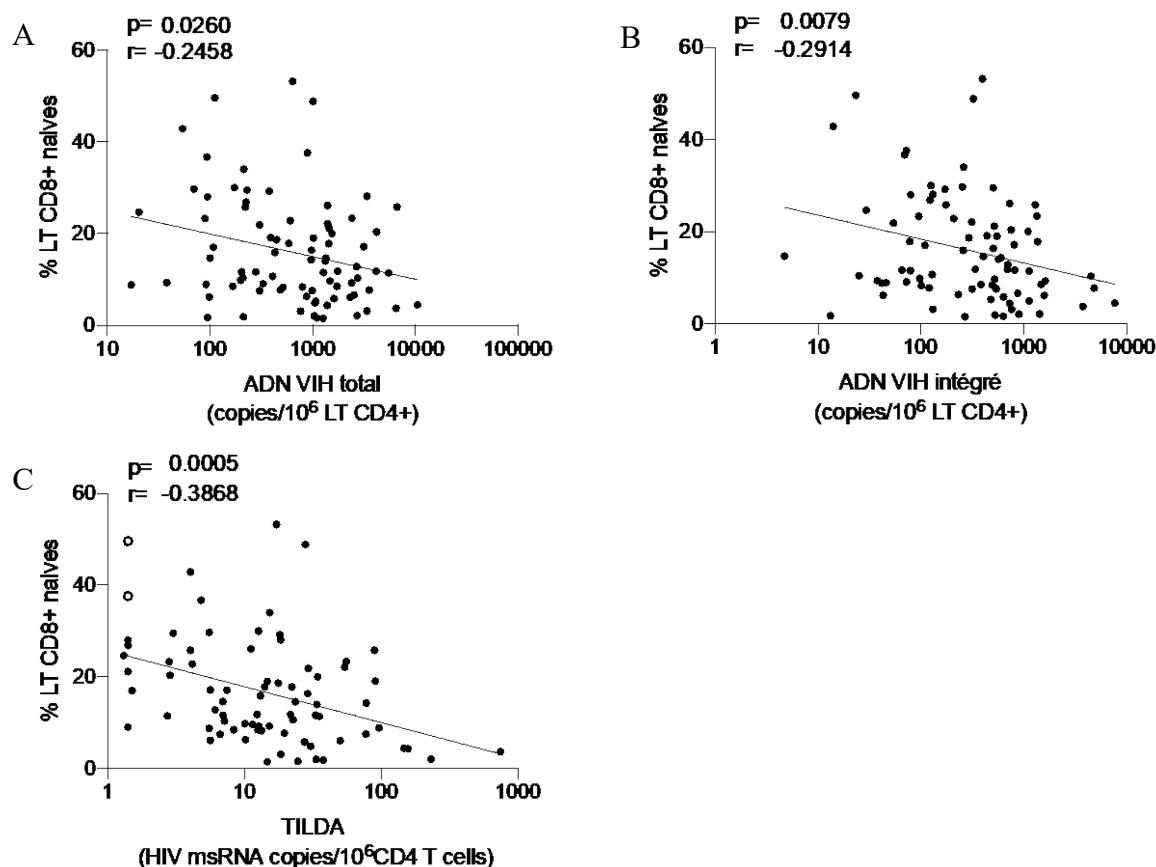


Figure 21. Corrélation entre divers marqueurs de la persistance virale et la fréquence de LT CD8+ naïfs mesurée par cytométrie en flux.

(A) Fréquence des LT CD8+ naïfs en fonction de la mesure de l'ADN total du VIH par qPCR (n=82). (B) Fréquence des LT CD8+ naïfs en fonction de la mesure de l'ADN intégré du VIH par qPCR (n=82). (C) Fréquence des LT CD8+ naïfs en fonction de la fréquence des LT CD4+ produisant de l'ARN viral suite à une stimulation PMA-ionomycine mesurée par TILDA (n=77). Les cercles vides représentent la limite de détection des échantillons non quantifiables. Les données ont été analysées par la corrélation de Spearman.

L'usage du corécepteur (CCR5 ou CXCR4) par les souches de VIH est un facteur variant avec le temps d'infection et qui pourrait avoir un impact sur la relation entre la fréquence de LT naïfs et l'importance du réservoir viral. En effet, contrairement aux cellules mémoires, les cellules naïves expriment de forts niveaux de CXCR4. Pour étudier cet impact, l'usage du corécepteur par le variant principal a été déterminé par analyse génétique de la boucle V3 de la protéine gp120. On observe que l'usage du corécepteur par le variant majoritaire n'est pas associé avec la durée de l'infection ni avec l'âge. Toutefois, les individus ayant un variant X4 sont tous âgés d'au moins 45 ans (p=0.3547 et p=0.1906,

respectivement) (Figure 22, A et B). De plus, l'usage du corécepteur ne semble pas être associé à la fréquence de LT CD4+ naïfs ($p= 0.6478$) (Figure 22, C). Finalement, aucune association n'est observée entre l'usage du corécepteur et la taille du réservoir mesurée par l'ADN total, intégré ou le TILDA ($p=0.7047$, $p= 0.5910$ et $p= 0.3437$, respectivement) (Figure 22, D, E et F).

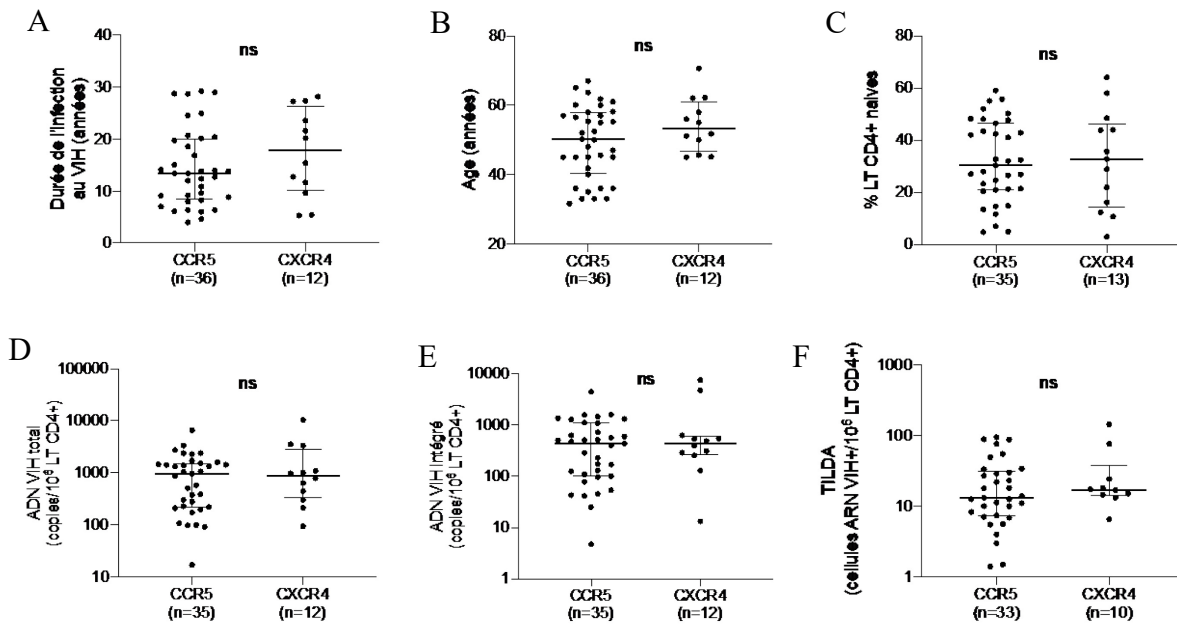


Figure 22. Répartition de certains facteurs en fonction de l'usage du co-récepteur par le variant viral principal.

Distribution de (A) l'âge, (B) la fréquence de LT CD4+ naïfs, (C) la fréquence de LT CD4+ portant de l'ADN viral total, (D) la fréquence de LT CD4+ portant de l'ADN viral intégré et (E) la fréquence de copies d'ARN induite par stimulation à la PMA-Ionomycine en fonction de l'usage du corécepteur du variant viral majoritaire. La médiane ainsi que l'écart interquartile sont représentés. Les données ont été analysées par le test de Mann-Whitney. ns $p>0.05$

La mesure de l'expression de marqueurs liés à l'activation, la prolifération et la fonctionnalité des LT CD4+ et CD8+ indique que la plupart de ces indicateurs varient entre les individus, mais sont relativement stables avec l'âge (Figure 18). Toutefois, on observe que l'expression du marqueur de sénescence CD57 sur les LT augmente en fonction de l'âge des individus. En effet, bien que l'association ne soit pas significative ($p=0.7146$), les LT CD4+ sénescents sont beaucoup plus importantes après 45 ans, où l'on observe des fréquences supérieures à 20% chez de nombreux individus (Figure 23, A). Pour ce qui est

des LT CD8+ CD57+, on observe une association significative avec l'âge des participants ($p=0.0275$) (Figure 23, B). Il n'y a pas d'association entre la fréquence des LT sénescents et les mesures de réservoir du VIH (Figure 18).

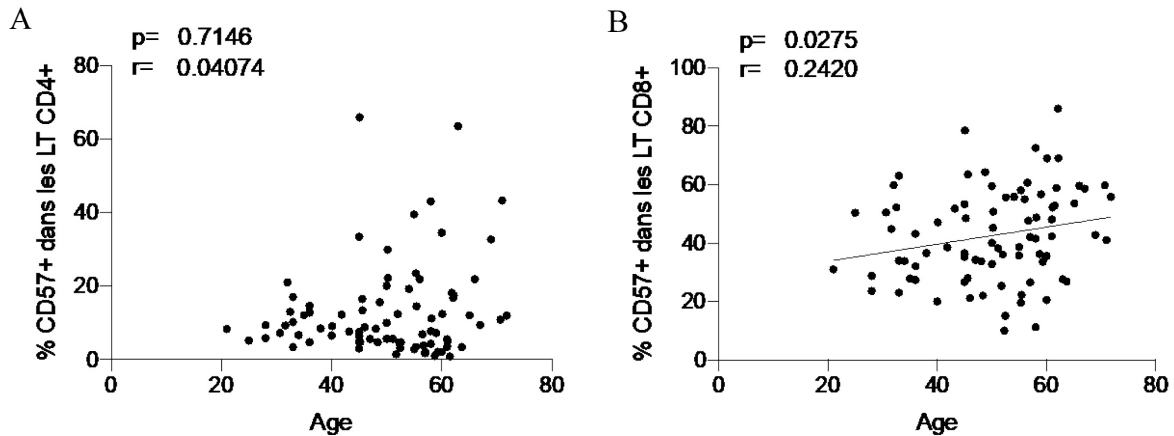


Figure 23. Fréquence de LT sénescents selon l'âge.

Fréquence des cellules exprimant le marqueur CD57 déterminée par cytométrie en flux, évaluée sur le total de LT (A) CD4+ (B) CD8+ en fonction de l'âge ($n=83$). Les données ont été analysées par le test de Spearman.

Nos résultats montrent que certains facteurs liés au processus de vieillissement sont également associés à la persistance virale. Afin de comprendre les implications cliniques de cette observation, nous avons étudié l'association entre la taille du réservoir du VIH et le développement de plaques d'athérosclérose, une comorbidité dont la prévalence augmente avec l'âge.

3.2 Étude transversale sur l'association entre le réservoir viral et le développement de plaques d'athérosclérose

Dans le but d'étudier la relation entre le développement de plaques d'athéroscléroses chez les personnes vivant avec le VIH et l'importance du réservoir viral sous TAR, nous avons réalisé une étude transversale. La présence de plaques d'athérosclérose a été évaluée chez 59 individus et a été relevée chez 62.7% d'entre eux. Le volume médian des plaques est de 444.9 mm^3 et varie de 6.7 à $1980,6 \text{ mm}^3$. Les individus ayant des plaques sont significativement plus âgés ($p=0.0300$) et sont infectés par le VIH ainsi que sous TAR depuis plus longtemps ($p=0.0116$ et $p=0.0289$ respectivement) que les individus n'ayant

pas de plaques d'athérosclérose. Il est intéressant de noter que le score de Framingham, utilisé dans un contexte clinique pour prédire le risque de développer une maladie cardiovasculaire, est semblable entre les deux groupes étudiés ($p=0.3173$) (Tableau 17).

Variables	MCV + (min – max)	MCV – (min – max)	Valeur P (Mann-Whitney)
n	37	22	NA
Âge	56.0 (44.2 – 74.4)	52.0 (40.6 – 70.1)	0.0300
Durée de l'infection par le VIH	19.5 (5.7 – 30.8)	14.6 (3.7 – 30.1)	0.0116
Âge à l'infection	37.5 (19.4 – 62.1)	37.5 (23.7 – 54.7)	0.8459
Durée de la TAR	14.7 (0 – 26.3)	10.6 (0.2 – 20.1)	0.0289
Âge à l'initiation de la TAR	41.2 (24.5 – 62.4)	41.4 (28.5 – 55.2)	0.8581
Durée de l'infection non traitée	4.1 (0 – 12)	4.1 (0 – 25.1)	0.3241
Score de Framingham	10.6 (3 -n 30)	8.9 (4 – 18)	0.3173
Compte CD4	593 (57 – 1386)	567.3 (54 – 1311)	0.7392
Compte CD8	855,2 (243 – 1885)	684.6 (288 – 1144)	0.0983
Ratio CD4/CD8	0.8 (0.1 – 2.3)	0.9 (0.1 – 1.5)	0.1848

Tableau 17. Données cliniques des participants à l'étude sur les plaques athérosclérotiques

La moyenne ainsi que les valeurs minimales et maximales sont représentées. Les données des participants ayant des plaques d'athérosclérose (MCV+) et ceux n'en ayant pas (MCV-) ont été comparées par le test de Mann-Whitney.

La taille du réservoir viral a été évaluée par la quantification de l'ADN total et intégré. L'activité résiduelle du réservoir a été évaluée par le ratio entre ces deux mesures ainsi que par la quantification de l'ARN viral LTR-gag associé aux cellules. On observe que les niveaux d'ADN total et intégré sont plus élevés chez les individus MCV+ que chez les individus MCV- ($p=0.0087$ et $p=0.0116$ respectivement) (Figure 24). Toutefois, le ratio ADN total/intégré ainsi que l'activité transcriptionnelle du réservoir ne diffère pas entre les deux groupes, indiquant que, bien que la taille du réservoir viral soit associée au développement de plaques d'athéroscléroses, son activité transcriptionnelle ne l'est pas.

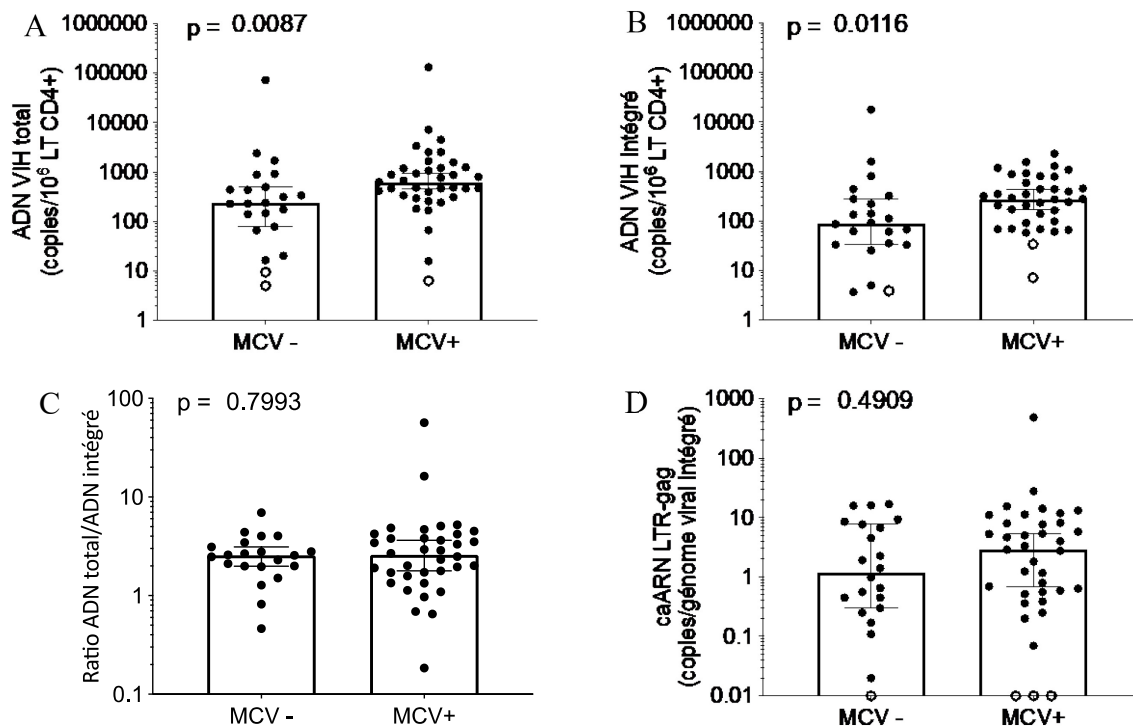


Figure 24. Association entre le développement de MCV sous-clinique et certains marqueurs de la persistance virale.

(A) Mesure de l'ADN total du VIH en fonction de la présence de plaques athérosclérotiques (MCV-; n=22, MCV+; n=37). (B) Mesure de l'ADN intégré du VIH en fonction de la présence de plaques athérosclérotiques (MCV-; n=22, MCV+; n=37). (C) Ratio des fréquences d'ADN total et intégré en fonction de la présence de plaques athérosclérotiques (MCV-; n=21, MCV+; n=36). (D) Mesure des ARN LTR-Gag associés aux cellules en fonction de la présence de plaques (MCV-; n=22, MCV+; n=37). Les mesures du réservoir ont été réalisées par qPCR sur l'ADN et l'ARN extraits simultanément de LT CD4+ enrichis. La médiane ainsi que l'intervalle de confiance sont représentés. Les cercles ouverts correspondent à la limite de détection des échantillons non quantifiables. Les données ont été analysées par le test de Mann-Whitney.

Toutefois, lorsque le volume des plaques est évalué comme une variable continue, il ne corrèle pas avec l'ADN total ni avec l'ADN intégré ($p=0.7602$ et $p=0.5142$ respectivement) (Figure 25).

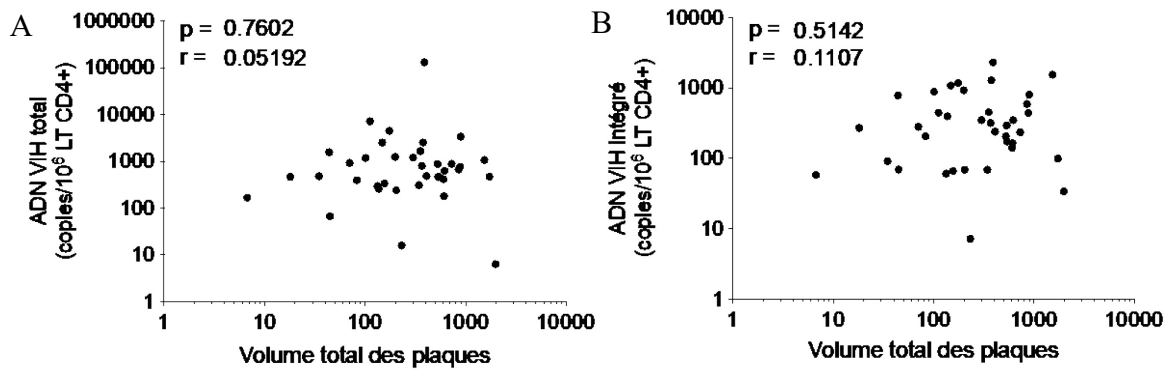


Figure 25. Corrélation entre le volume des plaques d'athérosclérose et les mesures de réservoir du VIH (n=37).

Corrélation entre le volume des plaques d'athérosclérose et les mesures de (A) l'ADN viral total et (B) l'ADN viral intégré. Le volume des plaques est évalué par scan CT et l'ADN total et intégré sont quantifiés par qPCR. Les données ont été analysées par la corrélation de Spearman.

Afin d'identifier les facteurs confondants pouvant influencer l'association entre les marqueurs du réservoir viral et la présence de plaques d'athérosclérose, nous avons étudié cette association avec ou sans la présence de potentiels facteurs confondants, soit l'âge, la durée de l'infection au VIH, le compte CD4 et le score de Framingham, grâce à un modèle de régression logistique. Le tableau 18 montre les coefficients de régression et les valeurs p associées aux différents modèles. La durée de l'infection et l'âge seraient des facteurs confondants, puisqu'en présence de ces deux facteurs, les coefficients de régression des marqueurs du réservoir changent par plus de 10% en passant du modèle univarié au modèle à deux variables. En effet, il est généralement admis dans la littérature qu'une variable est considérée comme confondante pour une variable d'exposition (ici les marqueurs de réservoir) si le coefficient de régression de cette dernière change par plus de 10% (Maldonado & Greenland, 1993). Cet effet de modulation du coefficient de régression associé aux mesures du réservoir n'est pas observé pour le compte CD4, du score de Framingham ou de la durée de l'infection non traitée. On peut également observer que l'association entre chaque marqueur du réservoir et la présence de plaques d'athérosclérose demeure significative pour les modèles bivariés intégrant ces trois variables (Tableau 18).

	ADN VIH total					ADN VIH intégré					
	Coefficient de régression	Δ coef	Odd ratio	Intervalle de confiance	Valeur P associée	Coefficient de régression	Δ coef	Odd ratio	Intervalle de confiance	Valeur P associée	
Marqueur de réservoir seul	1,97	NA	2,19	1,00 - 4,79	0,049	2,13	NA	2,62	1,08 - 6,34	0,033	
Âge	Réservoir	1,62	0,178	1,95	0,87 - 4,37	0,106	1,81	0,147	2,33	0,93 - 5,81	0,070
	Facteur	1,71	NA	1,09	0,99 - 1,20	0,088	1,73	NA	1,09	0,99 - 1,20	0,083
Compte CD4	Réservoir	2,04	0,036	2,32	1,03 - 5,23	0,042	2,25	0,056	2,83	1,14 - 7,03	0,025
	Facteur	0,74	NA	1,00	1,00 - 1,00	0,462	0,84	NA	1,00	1,00 - 1,00	0,401
Score de Framingham	Réservoir	1,88	0,046	2,13	0,97 - 4,68	0,061	2,04	0,039	2,55	1,04 - 6,28	0,041
	Facteur	0,97	NA	1,06	0,95 - 1,18	0,331	1,00	NA	1,06	0,95 - 1,18	0,320
Durée de l'infection	Réservoir	1,59	0,194	1,92	0,86 - 4,30	0,113	1,72	0,193	2,23	0,89 - 5,58	0,086
	Facteur	2,00	NA	1,08	1,00 - 1,17	0,046	1,95	NA	1,08	1,00 - 1,17	0,051
Durée de l'inf. non traitée	Réservoir	1,98	0,007	2,25	1,01 - 5,01	0,048	2,14	0,005	2,67	1,09 - 6,57	0,032
	Facteur	-0,35	NA	0,98	0,88 - 1,09	0,724	-0,32	NA	0,98	0,88 - 1,09	0,751

Tableau 18. Régression logistique pour résultat binaire.

Ces observations ont été confirmées en comparant deux modèles imbriqués, soit (1) l'ADN viral total ou intégré et (2) chaque marqueur du réservoir combiné à un autre facteur, grâce à la fonction ANOVA et au test Chisq. Le tableau 19 montre que le modèle à deux variables qui inclut la durée de l'infection au VIH prédit significativement mieux la présence de plaques que le modèle univarié ($p=0.039$ pour total, $p=0.044$ pour intégré). Un effet similaire est observé avec l'âge des participants, mais avec une significativité limite ($p=0.069$ pour total, $p=0.064$ pour intégré). Le compte CD4, le score de Framingham et la durée de l'infection non traitée ne contribuent pas de manière significative à la prédiction de la présence de plaques d'athéroscléroses lorsqu'évalués dans ce modèle statistique (Tableau 19).

	Valeurs P	
	ADN VIH total	ADN VIH intégré
Âge	0.069	0.064
Compte CD4	0.457	0.394
Score de Framingham	0.311	0.302
Durée de l'infection au VIH	0.039	0.044
Durée de l'infection non traitée	0.726	0.753
Combinaison de toutes les variables	0.090	0.065

Tableau 19. Résultat de tests ANOVA combinant chacun un facteur clinique ainsi qu'un marqueur de persistance du VIH, soit l'ADN viral total ou intégré.

Finalement, toutes les variables cliniques recueillies sont incluses dans un modèle de prédiction de la présence de plaques d'athérosclérose en utilisant la régression multiple régularisée de type LASSO. On observe que le modèle incluant l'âge, la durée de l'infection, la durée du traitement et, dans une moindre mesure, le compte CD8 est celui

qui contribue à la prédiction du résultat avec la meilleure performance, soit avec une précision de 67%. Lorsqu'on ajoute les mesures d'ADN viral total ou intégré, on observe qu'elles contribuent de façon importante au modèle (tableau 20). Plus particulièrement, cela se traduit par une augmentation respective de la précision de 7% et de 4% ainsi qu'une augmentation de 14% de la spécificité lorsque l'une ou l'autre des mesures sont incluses (de 31% à 45%).

Variable	Coefficient de régression		
	Sans réservoir	Avec ADN VIH total	Avec ADN VIH intégré
Âge	0.0457	0.0361	0.0378
Durée de la TAR	0.0073	0.0156	0.0155
Durée de l'infection	0.0446	0.0321	0.0307
Compte CD8	0.0009	0.0009	0.0008
Marqueur du réservoir	NA	0.3761	0.4786

Tableau 20. Coefficient de régression des paramètres cliniques significativement associé à la présence de plaques d'athérosclérose dans un modèle de régression multiple régularisé

Nos observations confirment que les mesures de la persistance virale sont associées à la présence de plaques d'athéroscléroses, mais que d'autres facteurs le sont également. Même si la relation de causalité entre la taille du réservoir du VIH et le développement de plaques d'athérosclérose demeure inconnue, il est possible qu'une réduction de la taille du réservoir puisse avoir un effet bénéfique sur la santé cardiovasculaire des individus vivant avec le VIH. Le réservoir viral étant le principal obstacle à la guérison du VIH, de nombreuses avenues thérapeutiques sont présentement étudiées. Toutefois, la compréhension des facteurs régissant la persistance virale, tels que l'homéostasie lymphocytaire et la fonctionnalité de la réponse immunitaire, est essentielle à la mise en place de telles stratégies. Nous avons étudié l'effet de la régénération thymique sur la taille du réservoir viral, via la prise d'une hormone de croissance recombinante.

3.3 Étude clinique longitudinale sur l'effet de la régénération thymique sur le réservoir

3.3.1 Description de l'étude hormone de croissance

L'hormone de croissance recombinante humaine a été administrée quotidiennement par auto-injection à 12 participants volontaires. Au moment de l'initiation de l'étude, ces individus étaient âgés de 32.6 ans et étaient diagnostiqués VIH+ depuis 7.7 ans en moyenne. La plupart des participants (58%) ont interrompu le traitement avant le suivi de 24 semaines et seulement 3 individus ont complété l'étude, c'est-à-dire 48 semaines de traitement (Tableau 21). Des neuf participants ayant interrompu le traitement, six l'ont fait pour cause de douleurs musculo-squelettiques, un suite au développement de gynécomastie, un pour cause d'inconfort occasionné par les injections répétées et un en prévision d'une chirurgie.

PID (n=12)	Sexe	Ethnicité	Âge (Années)	Durée de l'infection (années)	Temps sous TAR (années)	Compte CD4 (cell./µl)	Compte CD8 (cell./µl)	Ratio CD4/CD8	Notes
1	H	Caucasien	31.3	9.1	4.2	406	400	1.02	Discontinué après semaine 12.
3	H	Caucasien	38.3	3.1	3.1	669	750	0.89	Discontinué après semaine 12.
6	H	Caucasien	34.3	7.6	4.0	1208	1026	1.18	Étude complétée.
7	H	Hispanique	37.6	3.5	3.5	720	1091	0.66	Discontinué après semaine 12.
8	H	Caucasien	33.7	10.3	10.3	504	868	0.58	Discontinué à semaine 32.
9	F	Hispanique	39.2	12.1	12.1	770	588	1.31	Discontinué à semaine 7.
10	F	Afro-américaine	25.2	25.2	17.8	379	317	1.20	Étude complétée.
12	H	Afro-américain	36.8	11.5	11.4	688	953	0.72	Discontinué à semaine 23.
13	H	Caucasien	22.6	3.1	3.1	1150	883	1.30	Discontinué à semaine 5.
14	H	Caucasien	27.2	4	3.1	1260	1206	1.04	Étude complétée.
15	H	Caucasien	37.2	4	3.2	1643	952	1.73	Discontinué à semaine 28.
16	H	Caucasien	29.2	3.2	3.2	1229	1046	1.17	Discontinué à semaine 27.

Tableau 21. Données cliniques à l'initiation de l'étude pour les participants de l'étude sur hormone de croissance.

Pendant toute la durée du traitement à l'hormone de croissance recombinante, les comptes CD4 et CD8 sont demeurés relativement stables. Bien qu'on observe des variations chez certains individus, il n'y a pas de tendance significative au cours de l'étude (Figure 26). De plus, la charge virale plasmatique est demeurée indétectable chez tous les participants et à toutes les visites (données non représentées).

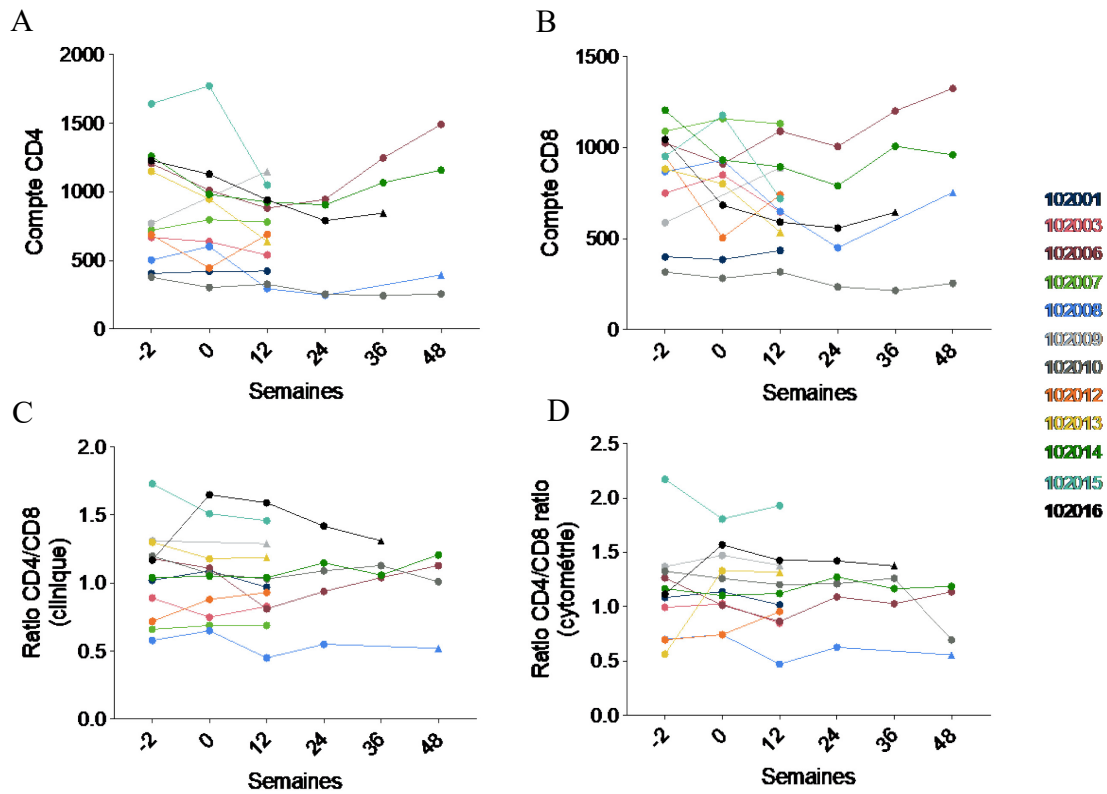


Figure 26. Évolution des comptes CD4 et CD8 durant le traitement.

(A) Compte CD4, (B) compte CD8, (C) ratio CD4/CD8 basé sur les données cliniques et (D) ratio CD4/CD8 basé sur les mesures de cytométrie en flux en fonction du temps sous traitement avec l'hormone de croissance humaine recombinante (n=12). Les triangles représentent les visites auxquelles un participant donné n'était plus sous rhGH.

3.3.2 Effet de l'administration d'hormone de croissance sur la production thymique

Dans un premier temps, l'impact de l'hormone de croissance recombinante sur la régénération du thymus a été évalué par la mesure de la production thymique. Cette dernière a été mesurée via la quantification des TRECs dans les LT CD4+ par qPCR ainsi que par la mesure de la fréquence des LT CD4+ naïfs RTE par cytométrie en flux. La fréquence de TRECS dans les LT CD4+ augmente au cours du traitement (Figure 27, A), particulièrement chez les individus qui demeurent sous traitement pour au moins 24

semaines. Dans l'ensemble, la production thymique évaluée par la fréquence des TRECs est plus importante au dernier point de suivi sous traitement par rapport au point de référence ($p=0.0137$) (Figure 27, B). Même si la tendance s'observe également lorsque la production thymique est évaluée par la mesure de la fréquence de LT CD4+ RTE, cette dernière n'est pas statistiquement significative ($p=0.37$) (Figure 27, C et D).

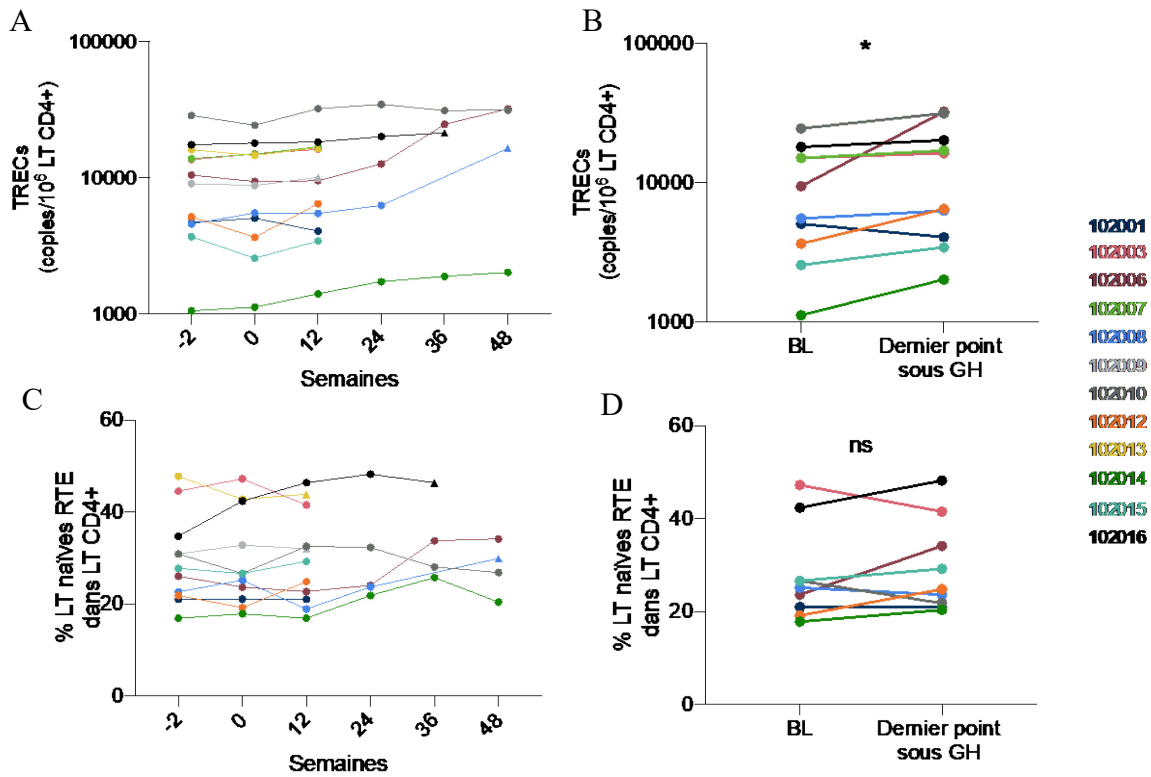


Figure 27. Effet de l'hormone de croissance sur la production thymique.

(A) Fréquence des TRECs dans les LT CD4+, mesurée par qPCR, en fonction du temps sous GH (n=12). (B) Différence entre la fréquence des TRECs dans les LT CD4+ au point de référence et au dernier point sous traitement (n=10). (C) Fréquence des LT CD4+ RTE, déterminée par cytométrie en flux comme LT CD4+/CD45RA+/CD27+/CD95-/CD31+, en fonction du temps sous GH (n=11). (D) Différence entre la fréquence des LT CD4+ RTE au point de référence et au dernier point sous traitement (n=9). Les triangles représentent les visites au cours desquelles l'individu n'était plus sous traitement. Les données ont été analysées avec le test de classement par les paires de Wilcoxon. ns $p>0.05$, * $p\leq 0.05$

3.3.3 Effet de l'administration de l'hormone de croissance sur la taille du réservoir du VIH

Afin d'évaluer l'impact de la prise d'hormone de croissance sur la taille du réservoir du VIH, nous avons utilisé 4 mesures de la persistance virale; l'ADN viral total et intégré ont été quantifiés par qPCR, le nombre de cellules produisant de l'ARN viral suite à une stimulation par PMA-ionomycine a été déterminé par TILDA et la fréquence des cellules produisant des particules virales infectieuses suite à une stimulation à la bryostatine et à l'IL-15 a été évaluée par b15-dfQVOA. Comme attendu, les mesures obtenues par la quantification de l'ADN viral étaient bien plus élevées que celles obtenues par TILDA ou par le B15QVOA. À noter que 3 individus présentaient des mesures de réservoir indétectables en TILDA ainsi qu'en QVOA (Figure 28).

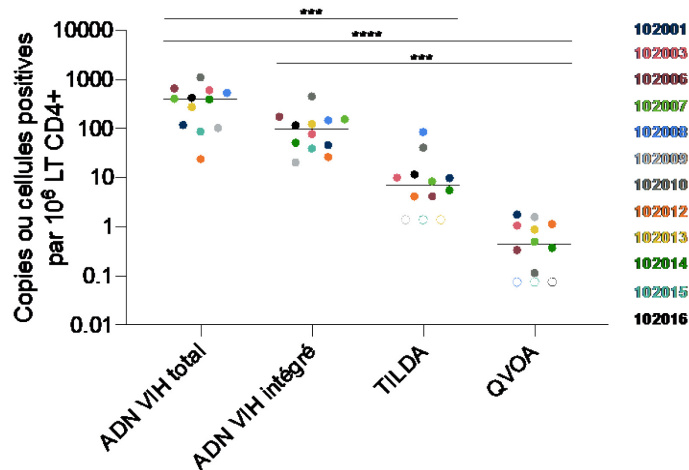


Figure 28. Mesure de la taille du réservoir du VIH par différents marqueurs de la persistance virale dans l'étude hormone de croissance.

Les symboles ouverts représentent la limite de détection des échantillons non quantifiables. Les données ont été analysées avec la comparaison multiple de Dunn (n=12). *** $p \leq 0.001$, **** $p \leq 0.0001$.

Lorsqu'on compare les mesures de réservoir au point de référence et au dernier point de suivi sous traitement avec l'hormone de croissance, on observe que plusieurs de ces marqueurs tendent à diminuer. Les niveaux d'ADN total mesurés par qPCR sont significativement plus faibles après le traitement à l'hormone de croissance recombinante ($p=0.0098$) (Figure 29, A). Toutefois, il s'agit de la seule mesure du réservoir qui se voit réduite de façon significative suite au traitement, la fréquence de l'ADN viral intégré ainsi que les valeurs du TILDA montrant une association non significative ($p=0.4922$ et

p=0.2383, respectivement) (Figure 29, B et C). Pour ce qui est du QVOA, bien que la différence entre le point de référence et le dernier point sous traitement ne soit pas statistiquement significative, on observe que les participants présentant les valeurs initiales les plus élevées montrent une importante diminution suite au traitement (p=0.1094) (Figure 29, D).

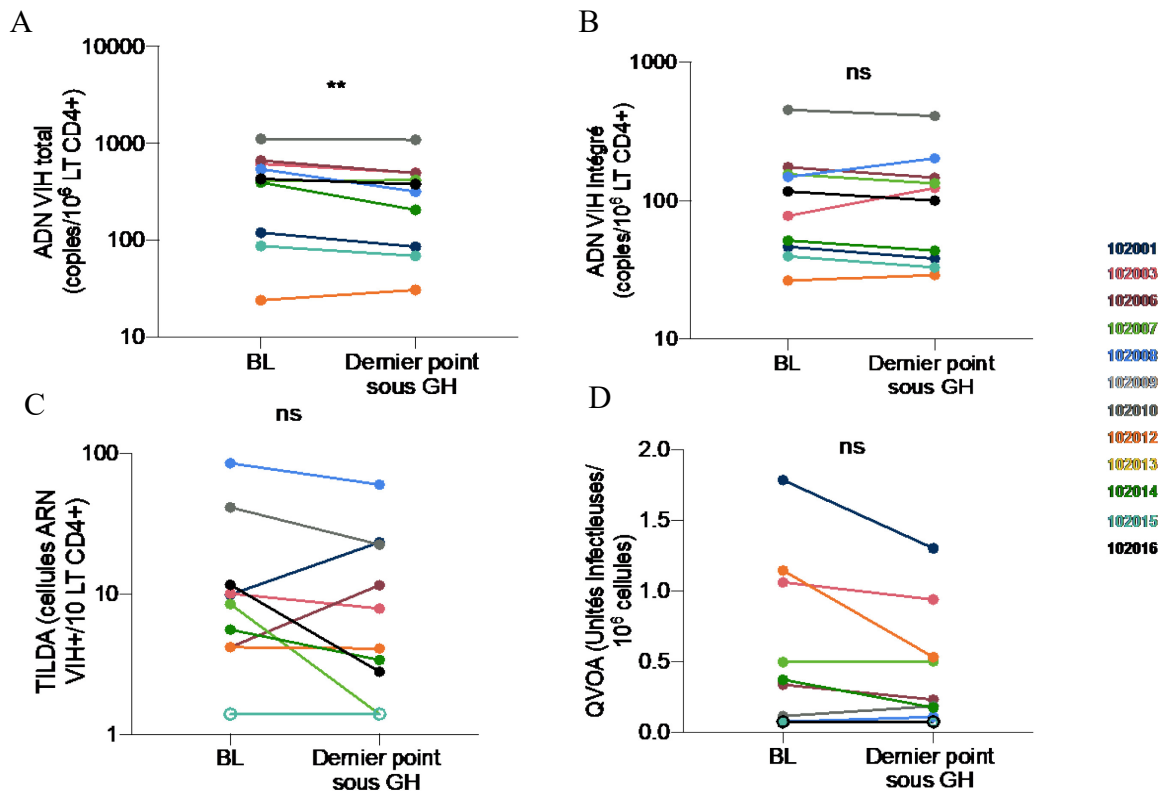
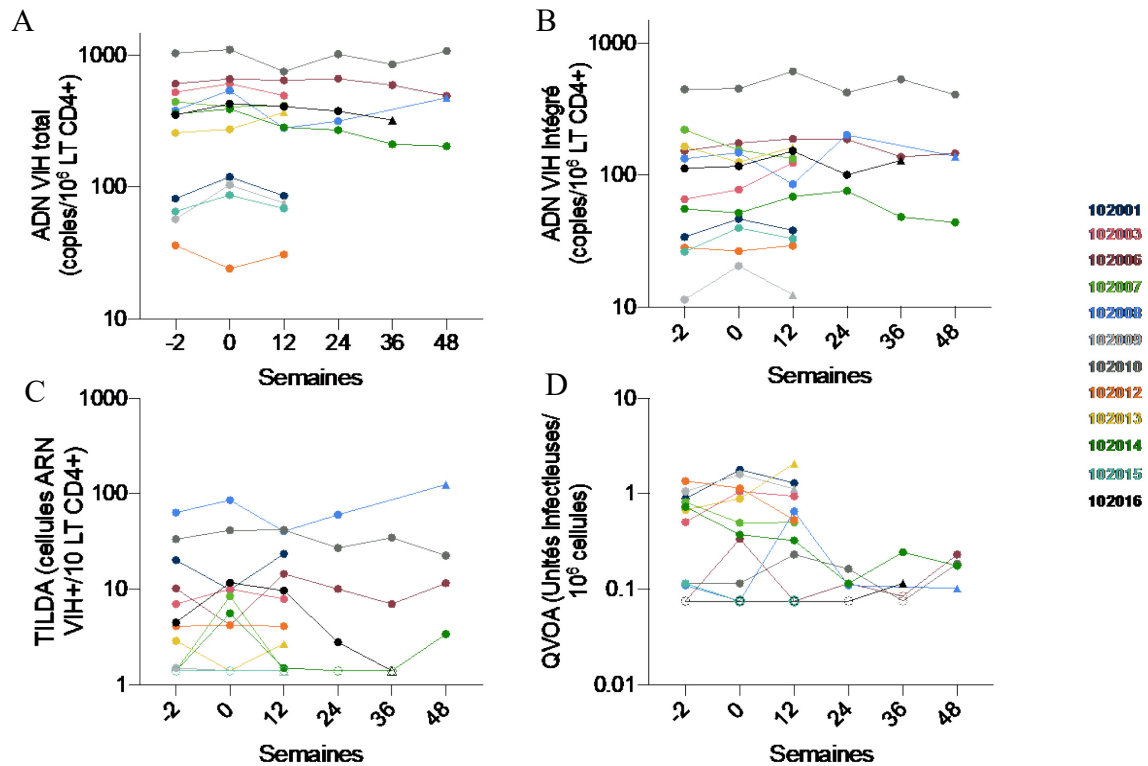


Figure 29. Effet de la prise d'hormone de croissance recombinante sur la taille du réservoir viral.

(A) Différence entre les niveaux d'ADN viral total au point de référence et au dernier point sous traitement. (B) Différence entre les niveaux d'ADN viral intégré au point de référence et au dernier point sous traitement. (C) Différence entre les fréquences des cellules produisant de l'ARN viral inductible au point de référence et au dernier point sous traitement. (D) Différence entre les fréquences d'unités infectieuses compétentes pour la réplication au point de référence et au dernier point sous traitement. Les symboles ouverts représentent la limite de détection des échantillons non quantifiables. Les données ont été analysées avec le test de classement par les paires de Wilcoxon (n=12). ns p>0.05, ** p≤0.01,.

Les mesures longitudinales du réservoir en fonction du temps sous traitement à l'hormone de croissance recombinante révèlent une variation entre les différents points de suivi. Cette fluctuation dans la taille du réservoir peut également être notée entre le point de référence et le point de présuivi, ce qui pourrait résulter de variations naturelles dans la taille du

réservoir ou d'une précision insuffisante dans les mesures du réservoir en raison de la très faible fréquence des événements détectés (Figure 30). Ainsi, le rôle bénéfique de l'hormone de croissance recombinante sur la taille des réservoirs du VIH reste à confirmer dans une étude plus grande avec un temps de suivi plus long.



3.3.4 Effet de l'administration de l'hormone de croissance sur le profil immunitaire

Puisque l'administration de l'hormone de croissance est connue pour augmenter la production thymique, celle-ci pourrait également avoir un effet sur l'homéostasie

lymphocytaire et sur le profil fonctionnel des lymphocytes T CD4+ et CD8+. Nous avons évalué cet effet en mesurant la fréquence des différents sous-types cellulaires par cytométrie en flux. On observe qu'au point de référence, la majorité des LT CD4+ présentent un phénotype naïf (44.8%) et que la majorité de ces derniers sont récemment émigrées du thymus (59.4%). On observe également que la fréquence des différents sous-types de LT CD4+ diminue en fonction de leur degré de différenciation (Figure 31, A). Pour les LT CD8+, on remarque que le pool cellulaire est constitué en majorité de LT naïfs et TEMRA+, avec des fréquences plus faibles et similaires de cellules mémoires TCM, TTM et TEM (Figure 31, B).

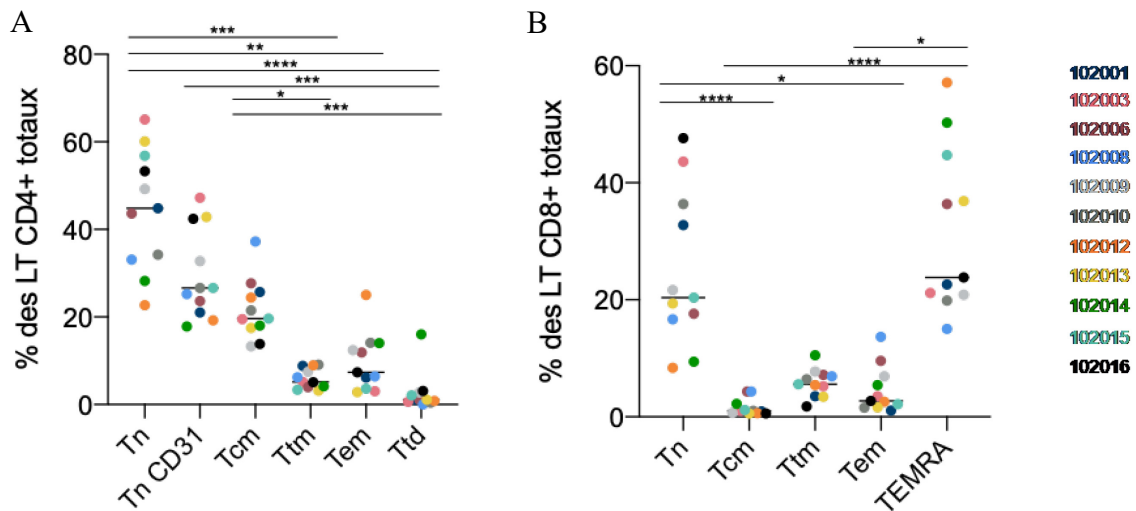


Figure 31. Fréquence des différentes sous-populations de LT avant l'initiation du traitement à l'hormone de croissance recombinante.

(A) Fréquence des sous-populations de LT CD4+ et (B) fréquence des sous-populations de LT CD8+ déterminées par cytométrie en flux au point de référence de l'étude (semaine 0). La médiane est représentée. Les données ont été analysées avec la comparaison multiple de Dunn (n=11). * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$, **** $p \leq 0.0001$.

Lorsqu'on observe la fréquence des différentes sous-populations lymphocytaires en fonction du temps sous traitement à l'hormone de croissance, on remarque que ces dernières demeurent relativement stables. En effet, il n'y a aucune variation significative dans la fréquence des sous-populations cellulaires suite à la prise de l'hormone de croissance recombinante, autant pour les LT CD4+ que pour les LT CD8+ (Figure 32). Ainsi, l'augmentation de la production thymique révélée par une augmentation de la

fréquence des TRECs dans les LT CD4+ ne se traduit pas par un changement dans la proportion des sous-populations lymphocytaires.

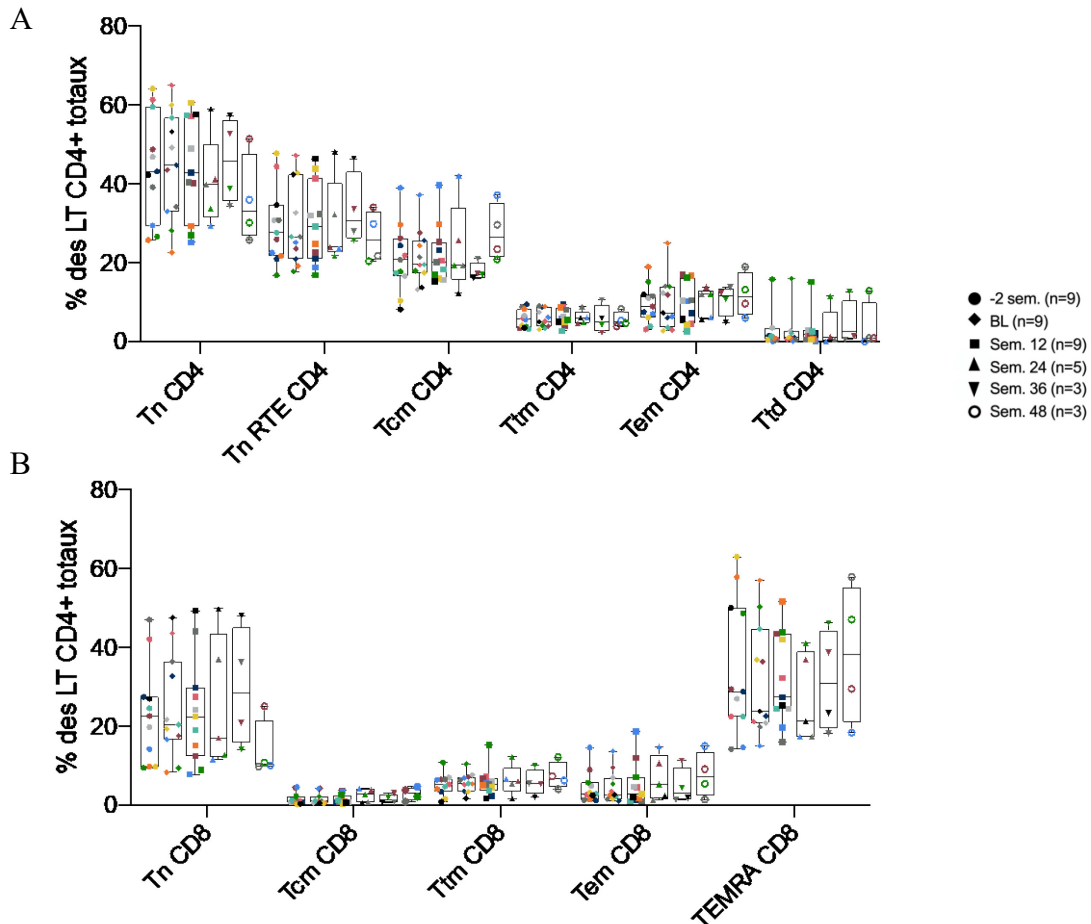


Figure 32. Effet du traitement à l'hormone de croissance recombinante sur les fréquences des sous-populations lymphocytaires.

(A) Fréquence des sous-types de LT CD4+ et (B) fréquence des sous-types de LT CD8+, déterminées par cytométrie en flux, en fonction du temps sous traitement à l'hormone de croissance recombinante. La médiane ainsi que l'étendue des données sont représentées. Les données ont été analysées avec le test de comparaison multiple de Dunn, mais aucune différence significative n'a été observée.

Finalement, nous avons évalué l'effet de l'hormone de croissance sur l'expression des marqueurs d'activation, de prolifération et de sénescence par cytométrie en flux. Nous observons que les marqueurs d'épuisement et de sénescence cellulaire, respectivement PD-1 et CD57, ainsi que les marqueurs de prolifération et d'activation, respectivement Ki67 et HLADR/CD38, ne varient pas significativement au cours du traitement à l'hormone de croissance, autant pour les LT CD4+ que pour les CD8+ (Figure 33).

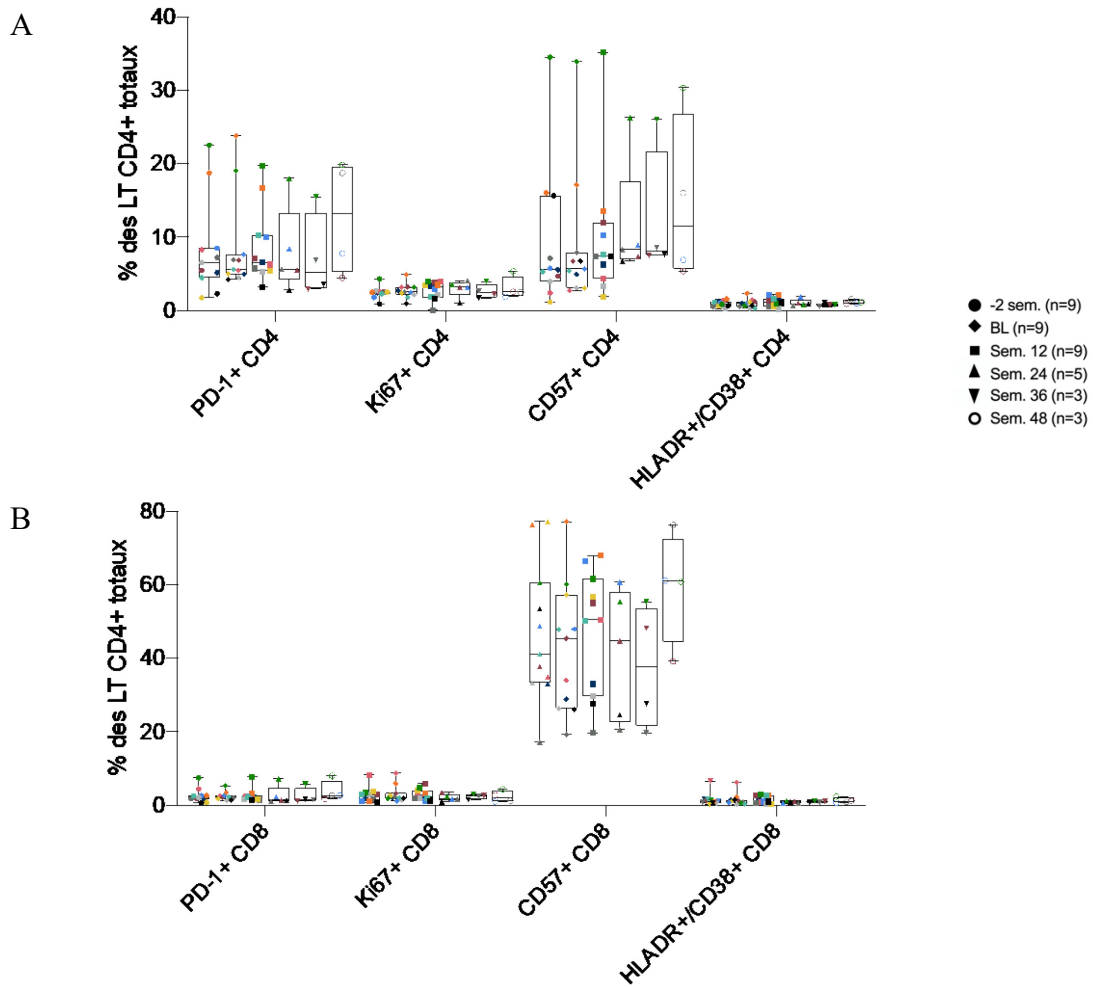


Figure 33. Effet du traitement à l'hormone de croissance recombinante sur l'expression des marqueurs de prolifération, d'activation et de sénescence.

(A) Fréquence de LT CD4+ et (B) LT CD8+ exprimant PD-1, Ki67, CD57 et HLA-DR/CD38 selon le temps sous traitement à l'hormone de croissance recombinante. La médiane ainsi que l'étendue des données sont représentées. Les données ont été analysées avec le test de comparaison multiple de Dunn, mais aucune différence significative n'a été observée.

Chapitre 4 : Discussion

4.1 Association entre les facteurs liés au vieillissement et le réservoir viral

Le vieillissement a un impact négatif sur la progression clinique de l'infection par le VIH ainsi que sur le développement de comorbidités (Egger et al., 2002; Rodriguez-Penney et al., 2013). Toutefois, sa relation avec le réservoir du VIH, considéré comme le principal obstacle à l'éradication du virus, est peu connue. Le premier objectif de cette étude transversale était donc d'identifier les facteurs associés au vieillissement qui contribuent à la persistance virale. Pour ce faire, nous avons mesuré plusieurs marqueurs immunologiques et virologiques dans les échantillons de 88 individus âgés de 21 à 72 ans.

4.1.1 Le réservoir inductible est plus important chez les individus âgés

En premier lieu, nous avons mis en évidence pour la première fois que le réservoir viral inductible, tel que mesuré par TILDA, corrèle avec l'âge des individus vivant avec le VIH. Le temps entre le moment d'infection et l'initiation de la TAR, considéré comme l'un des facteurs principaux déterminant la taille du réservoir, n'est pas significativement différent entre les deux groupes d'individus. Toutefois, les personnes âgées de plus de 58 ans vivent avec le VIH depuis plus longtemps que les personnes âgées de 40 ans et moins. Bien que la taille du réservoir soit connue pour être relativement stable dans le temps (Siliciano et al., 2003), le fait qu'une proportion importante des personnes plus âgées ait été traitée avant l'ère des trithérapies hautement efficaces est un facteur confondant potentiel important. En effet, l'efficacité moindre des agents antiviraux offerts à cette époque et l'adhérence plus faible, causée par les importants effets secondaires, sont des facteurs pouvant contribuer à des niveaux plus élevés de réservoir. Il est important de noter que l'association entre la taille du réservoir viral et l'âge n'est pas présente lorsque la taille du réservoir d'ADN total ou intégré ont été évalués. Cela suggère que la capacité de l'ADN viral à produire des transcrits viraux joue un rôle clé dans la différence observée. Il est possible que les cellules portant de l'ADN viral inductible soient soumises à une plus grande pression immunitaire

que celles ne produisant pas de transcrits viraux, en raison de leur capacité à synthétiser des produits viraux potentiellement immunogéniques. Globalement, ces résultats suggèrent que la pression immunitaire exercée sur le réservoir pourrait être plus importante chez les personnes jeunes que chez les personnes plus âgées et qu'il s'agit d'un facteur clé dans la différence de la taille du réservoir. Toutefois, les facteurs impliqués dans ce phénomène ne sont pas connus. Nous montrons que la production thymique, connue pour diminuer lors du vieillissement, influence également la taille du réservoir du VIH.

4.1.2 La fréquence des LT CD4+ naïfs influence les niveaux d'ADN viral total

Conséquemment avec ce qui a précédemment été décrit, nous observons que la production thymique diminue de façon importante avec l'âge, tel que montré par la quantification de TRECs par qPCR et des LT CD4+ naïfs exprimant CD31 par cytométrie de flux. Toutefois, nous mettons en évidence pour la première fois la relation entre la taille du réservoir viral et la production thymique. Premièrement, la production *de novo* de LT CD4+, telle qu'évaluée par la fréquence des LT CD4+ RTE, corrèle négativement avec la taille du réservoir intégré, mais pas avec la fréquence des cellules portant de l'ADN inductible. Cela suggère que l'involution thymique contribue à un mécanisme de persistance passif lié à la prolifération des cellules portant de l'ADN viral, indépendamment de leur capacité à produire des transcrits ou de protéines virales. La fréquence de LT CD4+ naïfs exprimant CD31 corrèle positivement avec la fréquence totale des lymphocytes naïfs, mais négativement avec tous les sous-types lymphocytaires mémoires. Ainsi, ces derniers contribuent de manière plus importante à la maintenance de la niche lymphocytaire lors de l'involution thymique, probablement par prolifération, ce qui se traduit par une augmentation de la fréquence de l'ADN viral intégré. L'association entre la taille du réservoir et la production thymique n'est cependant pas observée lorsque cette dernière est évaluée par la fréquence des TRECs dans les LT CD4+ plutôt que par la mesure des RTE par cytométrie en flux. Il est possible que la prolifération des cellules infectées contribue à cette observation. En effet, il est connu que la prolifération cellulaire n'affecte pas l'expression de CD31 sur les LT naïfs, alors que ce mécanisme entraîne la dilution des TRECs (Azevedo et al., 2009). De plus, des études antérieures proposent que, dans un

contexte d'infection par le VIH, la mesure de la production thymique par les TREC est biaisée par la déplétion des LT CD4⁺ et la prolifération qu'elle engendre (Drylewicz et al., 2016; Hazenberg et al., 2000). Dans notre étude, lorsqu'on compare le compte lymphocytaire CD4 absolu des personnes jeunes à celui des personnes plus âgées, on observe qu'il n'y a pas de différence significative entre les deux groupes malgré des activités thymiques différentes. Cela suggère que la prolifération homéostatique joue un rôle important dans le maintien de la niche lymphocytaire des individus plus âgés vivant avec le VIH. Ainsi, l'absence d'association entre l'ADN viral intégré et la fréquence des TRECs dans les LT CD4⁺ soutient l'importance de la prolifération dans la persistance virale. Il aurait été intéressant de quantifier les TRECs dans les LT CD8⁺, car ces derniers sont peu affectés par la déplétion lymphocytaire associée au VIH, n'étant pas ciblés par le virus. Cette information complémentaire aurait permis d'obtenir une quantification plus précise de la production thymique, indépendamment de l'effet direct de l'infection par le VIH. De plus, la quantification des niveaux plasmatiques d'IL-7, cytokine responsable du maintien de la niche CD4, aurait permis de mieux comprendre la dynamique lymphocytaire associée à l'involution thymique dans un contexte d'infection par le VIH. Il est important de noter que les variant viraux utilisant CXCR4 ont la capacité d'infecter les LT CD4⁺ naïfs, ce qui peut influencer l'homéostasie lymphocytaire. En effet, le changement de tropisme est souvent associé à une délétion lymphocytaire plus marquée, ce qui peut contribuer à la progression clinique du VIH. Puisque cela constitue un facteur confondant potentiel, nous avons évalué le tropisme du variant principal chez 48 participants de l'étude. Toutefois, nous montrons que les marqueurs immunologiques, viraux et cliniques ne sont pas significativement différents entre les deux groupes (CCR5 VS CXCR4). Cela suggère que l'involution thymique a un plus grand impact sur l'homéostasie lymphocytaire que le tropisme viral. Toutefois, des analyses multivariées seront requises pour mieux comprendre les différents facteurs impliqués dans ce processus.

4.1.3 La fréquence des LT CD8+ naïfs influence la fréquence des LT CD4+ portant de l'ADN viral inductible

Nous observons également que la proportion des cellules CD8+ naïves a un impact sur la taille du réservoir compétent pour la transcription. Puisque la fréquence des LT CD8+ naïfs est significativement réduite avec l'âge, cela suggère qu'elle constitue l'un des facteurs causant une plus grande persistance virale suite au vieillissement. Il est important de noter que, puisque la fréquence des LT CD8+ naïfs est peu affectée par l'infection par le VIH, celle-ci est étroitement liée à la production thymique et à la prolifération périphérique. Il est bien établi que les cellules CD8+ effectrices sont importantes pour limiter l'établissement du réservoir avant l'initiation de la thérapie ainsi que pour stimuler son élimination lors de stratégies thérapeutiques (Collins, Gaiha, & Walker, 2020; Migueles et al., 2008). Toutefois, le lien entre les sous-populations de cellules CD8+ et la persistance virale sous TAR est peu caractérisé. Nous mettons en évidence pour la première fois l'association entre la baisse de la production de LT CD8+ naïfs suite à l'involution thymique et la persistance du réservoir inductible dans un contexte de TAR. Cela peut avoir une implication importante pour la modélisation de la persistance virale, puisque les estimations actuelles du rythme d'élimination du réservoir ne prennent pas en considération le ralentissement de la production thymique avec l'âge. De plus, puisque le réservoir inductible est la cause du rebond viral et de l'inflammation persistante sous traitement, il est primordial d'étudier les mécanismes impliqués dans sa régulation. Nous observons que les différentes sous-populations de cellules effectrices mémoires sont associées à l'âge ainsi qu'à la fréquence des naïves, mais elles ne corrèlent pas avec la taille du réservoir viral. Cela suggère que la diversité du répertoire générée par la production *de novo* de LT CD8+, et la proportion de cellules mémoires, peut jouer un rôle dans le contrôle du réservoir inductible. Toutefois, des études supplémentaires seront requises pour vérifier cette hypothèse.

Ainsi, nos résultats suggèrent que la baisse de la production thymique chez les personnes âgées contribue à la persistance virale en augmentant la prolifération homéostatique des cellules CD4+ infectées de façon latente ainsi qu'en exerçant moins de pression par les CD8+ sur le réservoir compétent pour la réplication.

4.1.4 Le phénotype immunologique associé au vieillissement est modifié dans un contexte d'infection par le VIH

Il est connu que le phénomène *d'inflammaging* est exacerbé dans un contexte d'infection par le VIH (Deeks, 2009). Nous observons chez les individus participant à notre étude que le phénotype immunologique n'est que faiblement lié à l'âge chez les personnes qui vivent avec le VIH. En effet, les marqueurs d'activation normalement associés au processus de vieillissement, tels que les marqueurs HLADR et CD38 ainsi que le marqueur d'épuisement PD-1, ne sont pas significativement corrélés avec l'âge. Cela confirme l'impact de l'infection par le VIH sur le vieillissement prématuré du système immunitaire. On observe toutefois que la proportion de cellules sénescentes exprimant le marqueur CD57 est positivement associée à l'âge des participants de notre étude, ce qui concorde avec la littérature (Merino et al., 1998). En effet, il est connu que le compte absolu de LT CD57+ ne corrèle pas avec la progression clinique du VIH (Appay et al., 2011). Toutefois, nous montrons également que l'expression du marqueur CD57 n'est pas associée à la taille du réservoir viral. Cela vient confirmer que la diminution de la production thymique est un facteur important qui pourrait expliquer le lien entre le vieillissement et la taille du réservoir, puisque cette relation est indépendante du profil immunologique. Bien que la persistance virale semble exacerber les effets du vieillissement sur le profil inflammatoire, le caractère transversal de notre étude ainsi que les facteurs étudiés ne permettent pas de déterminer l'importance relative de ces deux facteurs. Toutefois, ces phénomènes sont indissociables et doivent être pris en considération dans l'étude de la taille du réservoir viral ainsi que des événements cliniques associés à l'infection au VIH.

4.2 Association entre le réservoir viral et le développement de plaques d'athérosclérose

L'inflammation joue un rôle important pour le développement de maladies cardiovasculaires. Ainsi, la prévalence des événements cardiovasculaires est augmentée chez les personnes plus âgées, mais également chez les personnes vivant avec le VIH (Freiberg et al., 2013). Puisque la persistance virale est associée au vieillissement et contribue à l'inflammation, le deuxième objectif de ce projet a été de déterminer s'il existe

une association entre la taille du réservoir et le développement de plaques d'athérosclérose chez des individus infectés par le VIH et sous TAR efficace.

4.2.1 Le réservoir viral est plus grand chez les individus vivant avec le VIH qui ont développé des plaques d'athéroscléroses

En premier lieu, nous montrons que la fréquence des cellules portant de l'ADN total ou intégré du VIH est plus élevée chez les individus séropositifs ayant développé des plaques d'athéroscléroses que chez les individus séropositifs ne présentant pas de dommages cardiovasculaires. Toutefois, les niveaux d'ADN total et intégré ne corrèlent pas avec le volume des plaques d'athéroscléroses. De plus, les marqueurs de l'activité du réservoir, soit le ratio d'ADN total/intégré et le niveau d'ARN viral associé aux cellules, n'étaient pas significativement différents chez les personnes présentant des plaques. Ces résultats suggèrent que le réservoir persistant sous TAR pourrait contribuer indirectement au développement de MCV ou qu'un facteur confondant, tel que l'inflammation, pourrait être à l'origine de cette association. Même si la majorité du réservoir s'établit avant l'initiation de la TAR (Abrahams et al., 2019; Brooks et al., 2020), nous montrons que la durée de l'infection non traitée n'était pas plus importante chez les personnes présentant des plaques. Ainsi, la différence de taille du réservoir des deux groupes peut-être dû à un niveau de réplication virale plus élevé avant l'initiation de la TAR chez les individus ayant développé des plaques d'athérosclérose. Il en résulterait une activation systémique plus importante et plus soutenue qui pourrait causer davantage de dommages irréversibles aux parois des vaisseaux sanguins, ce qui entraînerait une infiltration accrue des macrophages menant au développement de dommages cardiovasculaires (Fitch et al., 2013).

4.2.2 Certains marqueurs de la persistance virale contribuent à prédire le développement de plaques d'athérosclérose

Selon les modèles statistiques utilisés, la durée de l'infection ainsi que le temps sous traitement sont des prédicteurs du développement de plaques d'athéroscléroses chez les individus vivant avec le VIH et dont la virémie est contrôlée. Il est possible que la nature même de la TAR contribue à cette association puisqu'il est connu que les inhibiteurs de

protéase sont corrélés à une hausse de la dyslipidémie, ce qui augmente la prédisposition au développement de MCV (Group et al., 2007; Ryom et al., 2018). Nous montrons également que la taille du réservoir du VIH contribue autant aux modèles de prédiction que l'âge des individus, un facteur de risque bien connu au développement de MCV. Contrairement à la date d'infection par le VIH, qui est imprécise ou tout simplement inconnue pour de nombreux individus séropositifs, les marqueurs de persistance du VIH identifiés sont facilement quantifiables. Selon nos résultats, ils pourraient contribuer à prédire le risque de développer des plaques d'athérosclérose lorsque considérés avec les facteurs de risques traditionnels. Pour comprendre la réelle implication clinique des marqueurs de persistance virale et la façon dont ils sont liés avec le développement de MCV, des études mécanistiques devraient être conduites. Néanmoins, ces nouvelles données renforcent la nécessité de mettre au point des stratégies visant à réduire la taille du réservoir viral, puisque ce dernier a de nombreuses implications outre le fait qu'il cause le rebond viral suite à l'arrêt de la TAR.

4.3 Étude clinique longitudinale sur l'effet de la régénération thymique sur le réservoir

Nous avons montré que la production *de novo* de LT CD4⁺ et CD8⁺ est inversement corrélée à la taille du réservoir du VIH. Il est connu que l'administration d'hormone de croissance recombinante permet d'inverser le processus d'involution thymique (Taub et al., 2010). Afin de valider l'association entre le réservoir et la production thymique et d'étudier le potentiel thérapeutique de l'hormone de croissance, le troisième objectif de ce projet était de mesurer l'impact de la régénération thymique sur la taille du réservoir du VIH suite à la prise d'hormone de croissance humaine recombinante. Ainsi, nous avons contribué à la réalisation d'une étude clinique à laquelle 12 participants volontaires ont pris part.

4.3.1 L'injection d'hormone de croissance recombinante augmente la production thymique

Tout d'abord, nous montrons que la prise d'hormone de croissance permet d'augmenter la production thymique, comme le montre l'augmentation des niveaux de TRECs dans les LT CD4+. Cette association est plus évidente à partir de 24 semaines sous traitement, ce qui confirme les observations faites par d'autres groupes (Napolitano et al., 2008). Toutefois, lorsque la production thymique est évaluée par la fréquence de LT CD4+ naïfs RTE par cytométrie en flux, nous n'observons pas d'effet significatif de l'hormone de croissance. De plus, contrairement aux études préalables, nous n'observons pas d'augmentation marquée des comptes lymphocytaires CD4 ou CD8. Le fait que la régénération thymique ne soit pas aussi importante qu'initialement prévu peut-être en partie expliquée par les conditions non optimales de l'étude. En effet, moins de la moitié des participants de l'étude ont des points de suivis ultérieurs à la semaine 12, ce qui fait que la régénération thymique est sous-optimale pour la majorité des participants. Puisque seulement 3 individus ont poursuivi le traitement durant toute la durée prévue, l'échantillonnage est un problème majeur de ce projet. Ainsi, il serait nécessaire d'avoir un nombre de participants plus important lors d'études subséquentes ou d'utiliser une molécule présentant moins d'effets secondaires, mais générant des effets similaires sur l'activité thymique. De plus, il est possible que l'adhérence (injections quotidiennes) n'ait pas été optimale, puisque la plupart des participants ayant décidé d'abandonner l'étude l'ont fait suite à l'apparition d'effets secondaires mineurs ainsi que par inconfort lors des injections. Puisque l'adhérence peut avoir un impact sur l'efficacité du traitement, il aurait été intéressant d'effectuer une quantification plasmatique de l'hormone de croissance au cours de l'étude. De plus, l'évaluation de la taille du thymus par imagerie aurait permis de discerner l'impact de la régénération thymique sur la production *de novo* et son effet sur le compartiment périphérique. Néanmoins, Smith *et Al.* ont également soulevé certaines disparités quant à l'impact de l'hormone de croissance sur la fréquence des LT CD4+ CD31+, même dans un contexte de régénération thymique (Smith et al., 2010). Cela suggère que l'augmentation de la fréquence des TRECs chez plusieurs individus de notre étude témoigne d'un effet de l'hormone de croissance sur la production thymique.

4.3.2 L'ADN viral total est susceptible à une augmentation de la production thymique

Nous montrons que la fréquence d'ADN viral total est significativement plus basse au dernier point sous traitement par l'hormone de croissance que lors de l'initiation de l'étude. Cette diminution du réservoir est d'ailleurs plus marquée chez les individus ayant pris l'hormone de croissance pour au moins 24 semaines, ce qui corrèle avec la tendance observée quant à l'augmentation de la production thymique. Cette association est en accord avec le phénomène observé dans notre l'étude transversale, ce qui suggère que la pression homéostatique passive appliquée par la production thymique pourrait mener à la diminution du réservoir. Toutefois, des analyses biostatistiques plus poussées sont actuellement en cours afin de prendre en considération la variation naturelle ainsi que le temps sous traitement dans l'association entre la prise d'hormone de croissance et le réservoir viral. Il est intéressant de noter que, contrairement à nos observations précédentes, la régénération thymique ne semble pas être associée à une baisse du réservoir inductible ni du réservoir compétent pour la réplication. Une limitation majeure est que les participants de l'étude présentent en général un petit réservoir viral, ce qui rend difficile la mesure d'effets de faible magnitude. Cela traduit la réalité de l'infection par le VIH de nos jours, puisque tout comme ces participants, la majorité des personnes vivant avec le VIH amorcent la TAR rapidement suite à leur infection. Ainsi, il est extrêmement difficile d'évaluer l'impact de l'hormone de croissance sur ces réservoirs, puisque le caractère stochastique des méthodes employées ne permet pas de mettre en évidence la variation dans des événements très rares (Hataye et al., 2019).

4.3.3 L'administration de somatropine n'induit pas de changement marqué du phénotype immunologique

Nos résultats montrent que la régénération thymique suite à l'administration d'hormone de croissance n'a pas d'impact majeur sur le profil phénotypique. Nos résultats vont à l'encontre de ce qui était attendu, puisqu'il a préalablement été montré que le traitement à l'hormone de croissance est notamment associé à une diminution du niveau d'activation immunitaire ainsi qu'à un changement dans les proportions des différents sous-types

cellulaires (Herasimtschuk et al., 2013). Il est important de noter que nos participants étaient tous âgés de moins de 40 ans, ce qui se traduit par des niveaux d'inflammation modérés et une faible proportion de LT très différenciés dès le premier point de l'étude. Cela constitue une explication partielle au maintien du phénotype immunologique malgré le traitement à l'hormone de croissance. De plus, le faible nombre de participants, la grande variabilité entre les individus et l'arrêt prématuré du traitement chez la majorité des participants compliquent l'analyse préliminaire. Comme pour les autres facteurs étudiés, des analyses multiparamétriques sont en cours afin de prendre ces phénomènes en considération.

Au final, cette étude préliminaire confirme que l'hormone de croissance a un impact sur la production thymique. De plus, nous montrons pour la première fois que ce phénomène peut potentiellement diminuer certains marqueurs du réservoir du VIH, ce qui est en accord avec nos précédentes observations.

Chapitre 5 : Conclusion

Le but de ce projet était de déterminer la relation entre le vieillissement et la persistance virale chez des individus vivant avec le VIH sous trithérapie antirétrovirale. Tout d'abord, nous avons mis en évidence que le réservoir inductible est plus grand chez les personnes plus âgées que chez les personnes jeunes. De plus, nos résultats suggèrent que cette association pourrait être expliquée par le phénomène d'involution thymique, puisque nous avons mis en évidence qu'une activité thymique amoindrie est associée à la persistance du réservoir du VIH. Cette observation est appuyée par une diminution du réservoir total suite à la régénération thymique engendrée par l'administration d'hormone de croissance. À la lumière de nos résultats et des études antérieures, nous proposons que la diminution de l'apport en LT CD4⁺ contribue à la persistance virale en augmentant la prolifération homéostatique périphérique, probablement induite par l'IL-7. Il serait intéressant d'étudier l'impact de la régénération thymique dans un contexte thérapeutique, puisque l'apport en LT CD4⁺ naïfs pourrait prévenir la prolifération des cellules infectées, ce qui faciliterait leur contrôle.

Puisque la baisse de la production *de novo* de LT CD8⁺ naïfs est associée à un plus grand réservoir inductible, nous proposons également que l'involution thymique contribue à la persistance virale par l'appauvrissement du répertoire des lymphocytes T CD8⁺. Puisque le réservoir inductible est le plus susceptible de contribuer au rebond viral, il est important d'approfondir notre compréhension de ce phénomène. Nos résultats sont toutefois insuffisants pour nous permettre d'identifier clairement le mécanisme responsable du contrôle du réservoir inductible par la production de LT CD8⁺ naïfs. Une étude potentielle pourrait être d'évaluer l'impact de la régénération thymique sur la diversité antigénique du répertoire lymphocytaire, en particulier des cellules CD8⁺ spécifiques du VIH, dans un contexte d'étude du réservoir. Cela pourrait avoir des implications cliniques importantes, notamment dans le cadre de stratégies *shock and kill* (Collins et al., 2020; Deng et al., 2015).

Nous avons également mis en lumière pour la première fois une association positive entre la taille du réservoir et le développement de plaques d'athérosclérose chez les personnes infectées par le VIH. Considérant que les MCV sont de plus en plus prévalentes dans la population de personnes vivant avec le VIH, il est impératif d'identifier les facteurs responsables de cette association. Un immunophénotypage exhaustif et une caractérisation du profil inflammatoire au moment de l'initiation de la TAR et durant son administration, grâce à une technologie multi-analytes telle que la plateforme Luminex, pourrait être combinée à la quantification du réservoir et à un suivi du développement de plaques athérosclérotiques. Cela permettrait d'évaluer plus précisément la contribution de l'inflammation, un facteur confondant majeur, dans nos observations. De plus, il serait pertinent de conduire une étude prospective évaluant la pertinence de l'utilisation des mesures du réservoir viral comme facteur de risque au développement de MCV.

Au final, nos observations témoignent de l'importance de prendre en considération les processus associés au vieillissement lors d'études portant sur l'homéostasie du réservoir du VIH. Ce travail a contribué à une meilleure compréhension des mécanismes immunologiques contribuant à la persistance virale et de leur implication dans le développement de comorbidités. Nos résultats s'inscrivent dans un effort global d'identifier des cibles thérapeutiques novatrices et soulignent la complexité de l'homéostasie du réservoir du VIH.

Références

- Abrahams, M. R., Anderson, J. A., Giorgi, E. E., Seoighe, C., Mlisana, K., Ping, L. H., . . . Center for, H. I. V. A. V. I. C. (2009). Quantitating the multiplicity of infection with human immunodeficiency virus type 1 subtype C reveals a non-poisson distribution of transmitted variants. *J Virol*, *83*(8), 3556-3567. doi:10.1128/JVI.02132-08
- Abrahams, M. R., Joseph, S. B., Garrett, N., Tyers, L., Moeser, M., Archin, N., . . . Swanstrom, R. (2019). The replication-competent HIV-1 latent reservoir is primarily established near the time of therapy initiation. *Sci Transl Med*, *11*(513). doi:10.1126/scitranslmed.aaw5589
- Ait-Oufella, H., Taleb, S., Mallat, Z., & Tedgui, A. (2011). Recent advances on the role of cytokines in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, *31*(5), 969-979. doi:10.1161/ATVBAHA.110.207415
- Alkhatib, G., Combadiere, C., Broder, C. C., Feng, Y., Kennedy, P. E., Murphy, P. M., & Berger, E. A. (1996). CC CKR5: a RANTES, MIP-1alpha, MIP-1beta receptor as a fusion cofactor for macrophage-tropic HIV-1. *Science*, *272*(5270), 1955-1958. doi:10.1126/science.272.5270.1955
- Althoff, K. N., McGinnis, K. A., Wyatt, C. M., Freiberg, M. S., Gilbert, C., Oursler, K. K., . . . Veterans Aging Cohort, S. (2015). Comparison of risk and age at diagnosis of myocardial infarction, end-stage renal disease, and non-AIDS-defining cancer in HIV-infected versus uninfected adults. *Clin Infect Dis*, *60*(4), 627-638. doi:10.1093/cid/ciu869
- Appay, V., Almeida, J. R., Sauce, D., Autran, B., & Papagno, L. (2007). Accelerated immune senescence and HIV-1 infection. *Exp Gerontol*, *42*(5), 432-437. doi:10.1016/j.exger.2006.12.003
- Appay, V., Fastenackels, S., Katlama, C., Ait-Mohand, H., Schneider, L., Guihot, A., . . . Sauce, D. (2011). Old age and anti-cytomegalovirus immunity are associated with altered T-cell reconstitution in HIV-1-infected patients. *AIDS*, *25*(15), 1813-1822. doi:10.1097/QAD.0b013e32834640e6
- Autenrieth, C. S., Beck, E. J., Stelzle, D., Mallouris, C., Mahy, M., & Ghys, P. (2018). Global and regional trends of people living with HIV aged 50 and over: Estimates and projections for 2000-2020. *PLoS One*, *13*(11), e0207005. doi:10.1371/journal.pone.0207005
- Azevedo, R. I., Soares, M. V., Barata, J. T., Tendeiro, R., Serra-Caetano, A., Victorino, R. M., & Sousa, A. E. (2009). IL-7 sustains CD31 expression in human naive CD4+ T cells and preferentially expands the CD31+ subset in a PI3K-dependent manner. *Blood*, *113*(13), 2999-3007. doi:10.1182/blood-2008-07-166223

- Banga, R., Procopio, F. A., Noto, A., Pollakis, G., Cavassini, M., Ohmiti, K., . . . Perreau, M. (2016). PD-1(+) and follicular helper T cells are responsible for persistent HIV-1 transcription in treated aviremic individuals. *Nat Med*, *22*(7), 754-761. doi:10.1038/nm.4113
- Bar-On, Y., Gruell, H., Schoofs, T., Pai, J. A., Nogueira, L., Butler, A. L., . . . Nussenzweig, M. C. (2018). Safety and antiviral activity of combination HIV-1 broadly neutralizing antibodies in viremic individuals. *Nat Med*, *24*(11), 1701-1707. doi:10.1038/s41591-018-0186-4
- Barber, D. L., Wherry, E. J., Masopust, D., Zhu, B., Allison, J. P., Sharpe, A. H., . . . Ahmed, R. (2006). Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection. *Nature*, *439*(7077), 682-687. doi:10.1038/nature04444
- Barre-Sinoussi, F., Chermann, J. C., Rey, F., Nugeyre, M. T., Chamaret, S., Gruest, J., . . . Montagnier, L. (1983). Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science*, *220*(4599), 868-871. doi:10.1126/science.6189183
- Bartholomeeusen, K., Fujinaga, K., Xiang, Y., & Peterlin, B. M. (2013). Histone deacetylase inhibitors (HDACis) that release the positive transcription elongation factor b (P-TEFb) from its inhibitory complex also activate HIV transcription. *J Biol Chem*, *288*(20), 14400-14407. doi:10.1074/jbc.M113.464834
- Baxter, A. E., Niessl, J., Fromentin, R., Richard, J., Porichis, F., Massanella, M., . . . Kaufmann, D. E. (2017). Multiparametric characterization of rare HIV-infected cells using an RNA-flow FISH technique. *Nat Protoc*, *12*(10), 2029-2049. doi:10.1038/nprot.2017.079
- Betts, M. R., Nason, M. C., West, S. M., De Rosa, S. C., Migueles, S. A., Abraham, J., . . . Koup, R. A. (2006). HIV nonprogressors preferentially maintain highly functional HIV-specific CD8+ T cells. *Blood*, *107*(12), 4781-4789. doi:10.1182/blood-2005-12-4818
- Bleul, C. C., Wu, L., Hoxie, J. A., Springer, T. A., & Mackay, C. R. (1997). The HIV coreceptors CXCR4 and CCR5 are differentially expressed and regulated on human T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *94*(5), 1925-1930. doi:10.1073/pnas.94.5.1925
- Borducchi, E. N., Cabral, C., Stephenson, K. E., Liu, J., Abbink, P., Ng'ang'a, D., . . . Barouch, D. H. (2016). Ad26/MVA therapeutic vaccination with TLR7 stimulation in SIV-infected rhesus monkeys. *Nature*, *540*(7632), 284-287. doi:10.1038/nature20583
- Boritz, E. A., Darko, S., Swaszek, L., Wolf, G., Wells, D., Wu, X., . . . Douek, D. C. (2016). Multiple Origins of Virus Persistence during Natural Control of HIV Infection. *Cell*, *166*(4), 1004-1015. doi:10.1016/j.cell.2016.06.039

- Borrow, P., Lewicki, H., Wei, X., Horwitz, M. S., Pfeffer, N., Meyers, H., . . . Shaw, G. M. (1997). Antiviral pressure exerted by HIV-1-specific cytotoxic T lymphocytes (CTLs) during primary infection demonstrated by rapid selection of CTL escape virus. *Nat Med*, 3(2), 205-211. doi:10.1038/nm0297-205
- Bosque, A., Famiglietti, M., Weyrich, A. S., Goulston, C., & Planelles, V. (2011). Homeostatic proliferation fails to efficiently reactivate HIV-1 latently infected central memory CD4+ T cells. *PLoS Pathog*, 7(10), e1002288. doi:10.1371/journal.ppat.1002288
- Brenchley, J. M., Karandikar, N. J., Betts, M. R., Ambrozak, D. R., Hill, B. J., Crotty, L. E., . . . Koup, R. A. (2003). Expression of CD57 defines replicative senescence and antigen-induced apoptotic death of CD8+ T cells. *Blood*, 101(7), 2711-2720. doi:10.1182/blood-2002-07-2103
- Brenchley, J. M., Price, D. A., Schacker, T. W., Asher, T. E., Silvestri, G., Rao, S., . . . Douek, D. C. (2006). Microbial translocation is a cause of systemic immune activation in chronic HIV infection. *Nat Med*, 12(12), 1365-1371. doi:10.1038/nm1511
- Brenchley, J. M., Schacker, T. W., Ruff, L. E., Price, D. A., Taylor, J. H., Beilman, G. J., . . . Douek, D. C. (2004). CD4+ T cell depletion during all stages of HIV disease occurs predominantly in the gastrointestinal tract. *J Exp Med*, 200(6), 749-759. doi:10.1084/jem.20040874
- Brodin, J., Zanini, F., Thebo, L., Lanz, C., Bratt, G., Neher, R. A., & Albert, J. (2016). Establishment and stability of the latent HIV-1 DNA reservoir. *Elife*, 5. doi:10.7554/eLife.18889
- Brooks, K., Jones, B. R., Dilernia, D. A., Wilkins, D. J., Claiborne, D. T., McNally, S., . . . Hunter, E. (2020). HIV-1 variants are archived throughout infection and persist in the reservoir. *PLoS Pathog*, 16(6), e1008378. doi:10.1371/journal.ppat.1008378
- Brown, A. E., Nash, S., Connor, N., Kirwan, P. D., Ogaz, D., Croxford, S., . . . Delpech, V. C. (2018). Towards elimination of HIV transmission, AIDS and HIV-related deaths in the UK. *HIV Med*. doi:10.1111/hiv.12617
- Bruner, K. M., Murray, A. J., Pollack, R. A., Soliman, M. G., Laskey, S. B., Capoferri, A. A., . . . Siliciano, R. F. (2016). Defective proviruses rapidly accumulate during acute HIV-1 infection. *Nat Med*, 22(9), 1043-1049. doi:10.1038/nm.4156
- Bruner, K. M., Wang, Z., Simonetti, F. R., Bender, A. M., Kwon, K. J., Sengupta, S., . . . Siliciano, R. F. (2019). A quantitative approach for measuring the reservoir of latent HIV-1 proviruses. *Nature*, 566(7742), 120-125. doi:10.1038/s41586-019-0898-8
- Bui, J. K., Sobolewski, M. D., Keele, B. F., Spindler, J., Musick, A., Wiegand, A., . . . Mellors, J. W. (2017). Proviruses with identical sequences comprise a large fraction of the replication-

- competent HIV reservoir. *PLoS Pathog*, 13(3), e1006283. doi:10.1371/journal.ppat.1006283
- Buonaguro, L., Tornesello, M. L., & Buonaguro, F. M. (2007). Human immunodeficiency virus type 1 subtype distribution in the worldwide epidemic: pathogenetic and therapeutic implications. *J Virol*, 81(19), 10209-10219. doi:10.1128/JVI.00872-07
- Buzon, M. J., Sun, H., Li, C., Shaw, A., Seiss, K., Ouyang, Z., . . . Lichterfeld, M. (2014). HIV-1 persistence in CD4+ T cells with stem cell-like properties. *Nat Med*, 20(2), 139-142. doi:10.1038/nm.3445
- Cantero-Perez, J., Grau-Exposito, J., Serra-Peinado, C., Rosero, D. A., Luque-Ballesteros, L., Astorga-Gamaza, A., . . . Genesca, M. (2019). Resident memory T cells are a cellular reservoir for HIV in the cervical mucosa. *Nat Commun*, 10(1), 4739. doi:10.1038/s41467-019-12732-2
- Chaillon, A., Gianella, S., Dellicour, S., Rawlings, S. A., Schlub, T. E., De Oliveira, M. F., . . . Smith, D. M. (2020). HIV persists throughout deep tissues with repopulation from multiple anatomical sources. *J Clin Invest*, 130(4), 1699-1712. doi:10.1172/JCI134815
- Chomont, N., El-Far, M., Ancuta, P., Trautmann, L., Procopio, F. A., Yassine-Diab, B., . . . Sekaly, R. P. (2009). HIV reservoir size and persistence are driven by T cell survival and homeostatic proliferation. *Nat Med*, 15(8), 893-900. doi:10.1038/nm.1972
- Chun, T. W., Nickle, D. C., Justement, J. S., Meyers, J. H., Roby, G., Hallahan, C. W., . . . Fauci, A. S. (2008). Persistence of HIV in gut-associated lymphoid tissue despite long-term antiretroviral therapy. *J Infect Dis*, 197(5), 714-720. doi:10.1086/527324
- Chun, T. W., Stuyver, L., Mizell, S. B., Ehler, L. A., Mican, J. A., Baseler, M., . . . Fauci, A. S. (1997). Presence of an inducible HIV-1 latent reservoir during highly active antiretroviral therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94(24), 13193-13197. doi:10.1073/pnas.94.24.13193
- Cockerham, L. R., Siliciano, J. D., Sinclair, E., O'Doherty, U., Palmer, S., Yukl, S. A., . . . Deeks, S. G. (2014). CD4+ and CD8+ T cell activation are associated with HIV DNA in resting CD4+ T cells. *PLoS One*, 9(10), e110731. doi:10.1371/journal.pone.0110731
- Cohn, L. B., Silva, I. T., Oliveira, T. Y., Rosales, R. A., Parrish, E. H., Learn, G. H., . . . Nussenzweig, M. C. (2015). HIV-1 integration landscape during latent and active infection. *Cell*, 160(3), 420-432. doi:10.1016/j.cell.2015.01.020
- Colby, D. J., Trautmann, L., Pinyakorn, S., Leyre, L., Pagliuzza, A., Kroon, E., . . . group, R. V. s. (2018). Rapid HIV RNA rebound after antiretroviral treatment interruption in persons durably suppressed in Fiebig I acute HIV infection. *Nat Med*, 24(7), 923-926. doi:10.1038/s41591-018-0026-6

- Collins, D. R., Gaiha, G. D., & Walker, B. D. (2020). CD8(+) T cells in HIV control, cure and prevention. *Nat Rev Immunol*, *20*(8), 471-482. doi:10.1038/s41577-020-0274-9
- Connick, E., Mattila, T., Folkvord, J. M., Schlichtemeier, R., Meditz, A. L., Ray, M. G., . . . Skinner, P. J. (2007). CTL fail to accumulate at sites of HIV-1 replication in lymphoid tissue. *J Immunol*, *178*(11), 6975-6983. doi:10.4049/jimmunol.178.11.6975
- Crooks, A. M., Bateson, R., Cope, A. B., Dahl, N. P., Griggs, M. K., Kuruc, J. D., . . . Archin, N. M. (2015). Precise Quantitation of the Latent HIV-1 Reservoir: Implications for Eradication Strategies. *J Infect Dis*, *212*(9), 1361-1365. doi:10.1093/infdis/jiv218
- Dalglish, A. G., Beverley, P. C., Clapham, P. R., Crawford, D. H., Greaves, M. F., & Weiss, R. A. (1984). The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus. *Nature*, *312*(5996), 763-767. doi:10.1038/312763a0
- Dash, P. K., Kaminski, R., Bella, R., Su, H., Mathews, S., Ahooyi, T. M., . . . Gendelman, H. E. (2019). Sequential LASER ART and CRISPR Treatments Eliminate HIV-1 in a Subset of Infected Humanized Mice. *Nat Commun*, *10*(1), 2753. doi:10.1038/s41467-019-10366-y
- Davey, R. T., Jr., Bhat, N., Yoder, C., Chun, T. W., Metcalf, J. A., Dewar, R., . . . Lane, H. C. (1999). HIV-1 and T cell dynamics after interruption of highly active antiretroviral therapy (HAART) in patients with a history of sustained viral suppression. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *96*(26), 15109-15114. doi:10.1073/pnas.96.26.15109
- Day, C. L., Kaufmann, D. E., Kiepiela, P., Brown, J. A., Moodley, E. S., Reddy, S., . . . Walker, B. D. (2006). PD-1 expression on HIV-specific T cells is associated with T-cell exhaustion and disease progression. *Nature*, *443*(7109), 350-354. doi:10.1038/nature05115
- Deeks, S. G. (2009). Immune dysfunction, inflammation, and accelerated aging in patients on antiretroviral therapy. *Top HIV Med*, *17*(4), 118-123. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19890183>
- Deeks, S. G., Lewin, S. R., & Havlir, D. V. (2013). The end of AIDS: HIV infection as a chronic disease. *Lancet*, *382*(9903), 1525-1533. doi:10.1016/S0140-6736(13)61809-7
- Deeks, S. G., Lewin, S. R., Ross, A. L., Ananworanich, J., Benkirane, M., Cannon, P., . . . Zack, J. (2016). International AIDS Society global scientific strategy: towards an HIV cure 2016. *Nat Med*, *22*(8), 839-850. doi:10.1038/nm.4108
- Deng, K., Perteaux, M., Rongvaux, A., Wang, L., Durand, C. M., Ghiaur, G., . . . Siliciano, R. F. (2015). Broad CTL response is required to clear latent HIV-1 due to dominance of escape mutations. *Nature*, *517*(7534), 381-385. doi:10.1038/nature14053
- Desai, S., & Landay, A. (2010). Early immune senescence in HIV disease. *Curr HIV/AIDS Rep*, *7*(1), 4-10. doi:10.1007/s11904-009-0038-4

- Doitsh, G., Galloway, N. L., Geng, X., Yang, Z., Monroe, K. M., Zepeda, O., . . . Greene, W. C. (2014). Cell death by pyroptosis drives CD4 T-cell depletion in HIV-1 infection. *Nature*, *505*(7484), 509-514. doi:10.1038/nature12940
- Douek, D. C., McFarland, R. D., Keiser, P. H., Gage, E. A., Massey, J. M., Haynes, B. F., . . . Koup, R. A. (1998). Changes in thymic function with age and during the treatment of HIV infection. *Nature*, *396*(6712), 690-695. doi:10.1038/25374
- Dragic, T., Litwin, V., Allaway, G. P., Martin, S. R., Huang, Y., Nagashima, K. A., . . . Paxton, W. A. (1996). HIV-1 entry into CD4+ cells is mediated by the chemokine receptor CC-CKR-5. *Nature*, *381*(6584), 667-673. doi:10.1038/381667a0
- Drylewicz, J., Vrisekoop, N., Mugwagwa, T., de Boer, A. B., Otto, S. A., Hazenberg, M. D., . . . Borghans, J. A. (2016). Reconciling Longitudinal Naive T-Cell and TREC Dynamics during HIV-1 Infection. *PLoS One*, *11*(3), e0152513. doi:10.1371/journal.pone.0152513
- Duprez, D. A., Neuhaus, J., Kuller, L. H., Tracy, R., Bellosso, W., De Wit, S., . . . Group, I. S. S. (2012). Inflammation, coagulation and cardiovascular disease in HIV-infected individuals. *PLoS One*, *7*(9), e44454. doi:10.1371/journal.pone.0044454
- Durand, M., Chartrand-Lefebvre, C., Baril, J. G., Trottier, S., Trottier, B., Harris, M., . . . Aging Cohort, S. (2017). The Canadian HIV and aging cohort study - determinants of increased risk of cardio-vascular diseases in HIV-infected individuals: rationale and study protocol. *BMC Infect Dis*, *17*(1), 611. doi:10.1186/s12879-017-2692-2
- Duverger, A., Wolschendorf, F., Zhang, M., Wagner, F., Hatcher, B., Jones, J., . . . Kutsch, O. (2013). An AP-1 binding site in the enhancer/core element of the HIV-1 promoter controls the ability of HIV-1 to establish latent infection. *J Virol*, *87*(4), 2264-2277. doi:10.1128/JVI.01594-12
- Edagwa, B., McMillan, J., Sillman, B., & Gendelman, H. E. (2017). Long-acting slow effective release antiretroviral therapy. *Expert Opin Drug Deliv*, *14*(11), 1281-1291. doi:10.1080/17425247.2017.1288212
- Effros, R. B., Fletcher, C. V., Gebo, K., Halter, J. B., Hazzard, W. R., Horne, F. M., . . . High, K. P. (2008). Aging and infectious diseases: workshop on HIV infection and aging: what is known and future research directions. *Clin Infect Dis*, *47*(4), 542-553. doi:10.1086/590150
- Egger, M., May, M., Chene, G., Phillips, A. N., Ledergerber, B., Dabis, F., . . . Collaboration, A. R. T. C. (2002). Prognosis of HIV-1-infected patients starting highly active antiretroviral therapy: a collaborative analysis of prospective studies. *Lancet*, *360*(9327), 119-129. doi:10.1016/s0140-6736(02)09411-4

- Eisinger, R. W., Dieffenbach, C. W., & Fauci, A. S. (2019). HIV Viral Load and Transmissibility of HIV Infection: Undetectable Equals Untransmittable. *JAMA*, *321*(5), 451-452. doi:10.1001/jama.2018.21167
- Engelman, A., & Cherepanov, P. (2012). The structural biology of HIV-1: mechanistic and therapeutic insights. *Nat Rev Microbiol*, *10*(4), 279-290. doi:10.1038/nrmicro2747
- Eriksson, S., Graf, E. H., Dahl, V., Strain, M. C., Yukl, S. A., Lysenko, E. S., . . . Siliciano, J. D. (2013). Comparative analysis of measures of viral reservoirs in HIV-1 eradication studies. *PLoS Pathog*, *9*(2), e1003174. doi:10.1371/journal.ppat.1003174
- Estes, J. D., Kityo, C., Ssali, F., Swainson, L., Makamdop, K. N., Del Prete, G. Q., . . . Schacker, T. W. (2017). Defining total-body AIDS-virus burden with implications for curative strategies. *Nat Med*, *23*(11), 1271-1276. doi:10.1038/nm.4411
- Feng, Y., Broder, C. C., Kennedy, P. E., & Berger, E. A. (1996). HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor. *Science*, *272*(5263), 872-877. doi:10.1126/science.272.5263.872
- Ferrando-Martinez, S., Ruiz-Mateos, E., Hernandez, A., Gutierrez, E., Rodriguez-Mendez Mdel, M., Ordonez, A., & Leal, M. (2011). Age-related deregulation of naive T cell homeostasis in elderly humans. *Age (Dordr)*, *33*(2), 197-207. doi:10.1007/s11357-010-9170-8
- Fiebig, E. W., Wright, D. J., Rawal, B. D., Garrett, P. E., Schumacher, R. T., Peddada, L., . . . Busch, M. P. (2003). Dynamics of HIV viremia and antibody seroconversion in plasma donors: implications for diagnosis and staging of primary HIV infection. *AIDS*, *17*(13), 1871-1879. doi:10.1097/00002030-200309050-00005
- Finzi, D., Blankson, J., Siliciano, J. D., Margolick, J. B., Chadwick, K., Pierson, T., . . . Siliciano, R. F. (1999). Latent infection of CD4+ T cells provides a mechanism for lifelong persistence of HIV-1, even in patients on effective combination therapy. *Nat Med*, *5*(5), 512-517. doi:10.1038/8394
- Finzi, D., Hermankova, M., Pierson, T., Carruth, L. M., Buck, C., Chaisson, R. E., . . . Siliciano, R. F. (1997). Identification of a reservoir for HIV-1 in patients on highly active antiretroviral therapy. *Science*, *278*(5341), 1295-1300. doi:10.1126/science.278.5341.1295
- Fischl, M. A., Richman, D. D., Grieco, M. H., Gottlieb, M. S., Volberding, P. A., Laskin, O. L., . . . et al. (1987). The efficacy of azidothymidine (AZT) in the treatment of patients with AIDS and AIDS-related complex. A double-blind, placebo-controlled trial. *N Engl J Med*, *317*(4), 185-191. doi:10.1056/NEJM198707233170401

- Fitch, K. V., Srinivasa, S., Abbara, S., Burdo, T. H., Williams, K. C., Eneh, P., . . . Grinspoon, S. K. (2013). Noncalcified coronary atherosclerotic plaque and immune activation in HIV-infected women. *J Infect Dis*, *208*(11), 1737-1746. doi:10.1093/infdis/jit508
- Fletcher, C. V., Staskus, K., Wietgreffe, S. W., Rothenberger, M., Reilly, C., Chipman, J. G., . . . Schacker, T. W. (2014). Persistent HIV-1 replication is associated with lower antiretroviral drug concentrations in lymphatic tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *111*(6), 2307-2312. doi:10.1073/pnas.1318249111
- Franceschi, C., Capri, M., Monti, D., Giunta, S., Olivieri, F., Sevini, F., . . . Salvioli, S. (2007). Inflammaging and anti-inflammaging: a systemic perspective on aging and longevity emerged from studies in humans. *Mech Ageing Dev*, *128*(1), 92-105. doi:10.1016/j.mad.2006.11.016
- Freiberg, M. S., Chang, C. C., Kuller, L. H., Skanderson, M., Lowy, E., Kraemer, K. L., . . . Justice, A. C. (2013). HIV infection and the risk of acute myocardial infarction. *JAMA Intern Med*, *173*(8), 614-622. doi:10.1001/jamainternmed.2013.3728
- Freund, A., Orjalo, A. V., Desprez, P. Y., & Campisi, J. (2010). Inflammatory networks during cellular senescence: causes and consequences. *Trends Mol Med*, *16*(5), 238-246. doi:10.1016/j.molmed.2010.03.003
- Fromentin, R., Bakeman, W., Lawani, M. B., Khoury, G., Hartogensis, W., DaFonseca, S., . . . Chomont, N. (2016). CD4+ T Cells Expressing PD-1, TIGIT and LAG-3 Contribute to HIV Persistence during ART. *PLoS Pathog*, *12*(7), e1005761. doi:10.1371/journal.ppat.1005761
- Fromentin, R., DaFonseca, S., Costiniuk, C. T., El-Far, M., Procopio, F. A., Hecht, F. M., . . . Chomont, N. (2019). PD-1 blockade potentiates HIV latency reversal ex vivo in CD4(+) T cells from ART-suppressed individuals. *Nat Commun*, *10*(1), 814. doi:10.1038/s41467-019-08798-7
- Fukazawa, Y., Lum, R., Okoye, A. A., Park, H., Matsuda, K., Bae, J. Y., . . . Picker, L. J. (2015). B cell follicle sanctuary permits persistent productive simian immunodeficiency virus infection in elite controllers. *Nat Med*, *21*(2), 132-139. doi:10.1038/nm.3781
- Gantner, P., Pagliuzza, A., Pardons, M., Ramgopal, M., Routy, J. P., Fromentin, R., & Chomont, N. (2020). Single-cell TCR sequencing reveals phenotypically diverse clonally expanded cells harboring inducible HIV proviruses during ART. *Nat Commun*, *11*(1), 4089. doi:10.1038/s41467-020-17898-8
- Garcia-Broncano, P., Maddali, S., Einkauf, K. B., Jiang, C., Gao, C., Chevalier, J., . . . Lichterfeld, M. (2019). Early antiretroviral therapy in neonates with HIV-1 infection restricts viral

- reservoir size and induces a distinct innate immune profile. *Sci Transl Med*, 11(520). doi:10.1126/scitranslmed.aax7350
- Gottlieb, M. S., Schroff, R., Schanker, H. M., Weisman, J. D., Fan, P. T., Wolf, R. A., & Saxon, A. (1981). Pneumocystis carinii pneumonia and mucosal candidiasis in previously healthy homosexual men: evidence of a new acquired cellular immunodeficiency. *N Engl J Med*, 305(24), 1425-1431. doi:10.1056/NEJM198112103052401
- Grabar, S., Kousignian, I., Sobel, A., Le Bras, P., Gasnault, J., Enel, P., . . . Costagliola, D. (2004). Immunologic and clinical responses to highly active antiretroviral therapy over 50 years of age. Results from the French Hospital Database on HIV. *AIDS*, 18(15), 2029-2038. doi:10.1097/00002030-200410210-00007
- Group, D. A. D. S., Friis-Moller, N., Reiss, P., Sabin, C. A., Weber, R., Monforte, A., . . . Lundgren, J. D. (2007). Class of antiretroviral drugs and the risk of myocardial infarction. *N Engl J Med*, 356(17), 1723-1735. doi:10.1056/NEJMoa062744
- Guaraldi, G., Franconi, I., Milic, J., Besutti, G., Pintassilgo, I., Scaglioni, R., . . . Mussini, C. (2019). Thymus Imaging Detection and Size Is Inversely Associated With Metabolic Syndrome and Frailty in People With HIV. *Open Forum Infect Dis*, 6(10), ofz435. doi:10.1093/ofid/ofz435
- Gupta, R. K., Peppas, D., Hill, A. L., Galvez, C., Salgado, M., Pace, M., . . . Olavarria, E. (2020). Evidence for HIV-1 cure after CCR5Delta32/Delta32 allogeneic haemopoietic stem-cell transplantation 30 months post analytical treatment interruption: a case report. *Lancet HIV*. doi:10.1016/S2352-3018(20)30069-2
- Hatano, H., Jain, V., Hunt, P. W., Lee, T. H., Sinclair, E., Do, T. D., . . . Deeks, S. G. (2013). Cell-based measures of viral persistence are associated with immune activation and programmed cell death protein 1 (PD-1)-expressing CD4+ T cells. *J Infect Dis*, 208(1), 50-56. doi:10.1093/infdis/jis630
- Hataye, J. M., Casazza, J. P., Best, K., Liang, C. J., Immonen, T. T., Ambrozak, D. R., . . . Koup, R. A. (2019). Principles Governing Establishment versus Collapse of HIV-1 Cellular Spread. *Cell Host Microbe*, 26(6), 748-763 e720. doi:10.1016/j.chom.2019.10.006
- Haynes, B. F., Gilbert, P. B., McElrath, M. J., Zolla-Pazner, S., Tomaras, G. D., Alam, S. M., . . . Kim, J. H. (2012). Immune-correlates analysis of an HIV-1 vaccine efficacy trial. *N Engl J Med*, 366(14), 1275-1286. doi:10.1056/NEJMoa1113425
- Hazenbergh, M. D., Otto, S. A., Cohen Stuart, J. W., Verschuren, M. C., Borleffs, J. C., Boucher, C. A., . . . Miedema, F. (2000). Increased cell division but not thymic dysfunction rapidly

- affects the T-cell receptor excision circle content of the naive T cell population in HIV-1 infection. *Nat Med*, 6(9), 1036-1042. doi:10.1038/79549
- Henrich, T. J., Hobbs, K. S., Hanhauser, E., Scully, E., Hogan, L. E., Robles, Y. P., . . . Kuritzkes, D. R. (2017). Human Immunodeficiency Virus Type 1 Persistence Following Systemic Chemotherapy for Malignancy. *J Infect Dis*, 216(2), 254-262. doi:10.1093/infdis/jix265
- Herasimtschuk, A. A., Hansen, B. R., Langkilde, A., Moyle, G. J., Andersen, O., & Imami, N. (2013). Low-dose growth hormone for 40 weeks induces HIV-1-specific T cell responses in patients on effective combination anti-retroviral therapy. *Clin Exp Immunol*, 173(3), 444-453. doi:10.1111/cei.12141
- Hiener, B., Horsburgh, B. A., Eden, J. S., Barton, K., Schlub, T. E., Lee, E., . . . Palmer, S. (2017). Identification of Genetically Intact HIV-1 Proviruses in Specific CD4(+) T Cells from Effectively Treated Participants. *Cell Rep*, 21(3), 813-822. doi:10.1016/j.celrep.2017.09.081
- Hirsch, V. M., Olmsted, R. A., Murphey-Corb, M., Purcell, R. H., & Johnson, P. R. (1989). An African primate lentivirus (SIVsm) closely related to HIV-2. *Nature*, 339(6223), 389-392. doi:10.1038/339389a0
- Hiscott, J., Kwon, H., & Genin, P. (2001). Hostile takeovers: viral appropriation of the NF-kappaB pathway. *J Clin Invest*, 107(2), 143-151. doi:10.1172/JCI11918
- Ho, Y. C., Shan, L., Hosmane, N. N., Wang, J., Laskey, S. B., Rosenbloom, D. I., . . . Siliciano, R. F. (2013). Replication-competent noninduced proviruses in the latent reservoir increase barrier to HIV-1 cure. *Cell*, 155(3), 540-551. doi:10.1016/j.cell.2013.09.020
- Hocqueloux, L., Avettand-Fenoel, V., Jacquot, S., Prazuck, T., Legac, E., Melard, A., . . . Virales, A. C. o. t. A. N. d. R. s. l. S. e. l. H. (2013). Long-term antiretroviral therapy initiated during primary HIV-1 infection is key to achieving both low HIV reservoirs and normal T cell counts. *J Antimicrob Chemother*, 68(5), 1169-1178. doi:10.1093/jac/dks533
- Honeycutt, J. B., Thayer, W. O., Baker, C. E., Ribeiro, R. M., Lada, S. M., Cao, Y., . . . Garcia, J. V. (2017). HIV persistence in tissue macrophages of humanized myeloid-only mice during antiretroviral therapy. *Nat Med*, 23(5), 638-643. doi:10.1038/nm.4319
- Hosmane, N. N., Kwon, K. J., Bruner, K. M., Capoferri, A. A., Beg, S., Rosenbloom, D. I., . . . Siliciano, R. F. (2017). Proliferation of latently infected CD4(+) T cells carrying replication-competent HIV-1: Potential role in latent reservoir dynamics. *J Exp Med*, 214(4), 959-972. doi:10.1084/jem.20170193
- Hsue, P. Y., Deeks, S. G., & Hunt, P. W. (2012). Immunologic basis of cardiovascular disease in HIV-infected adults. *J Infect Dis*, 205 Suppl 3, S375-382. doi:10.1093/infdis/jis200

- Hu, W., Kaminski, R., Yang, F., Zhang, Y., Cosentino, L., Li, F., . . . Khalili, K. (2014). RNA-directed gene editing specifically eradicates latent and prevents new HIV-1 infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *111*(31), 11461-11466. doi:10.1073/pnas.1405186111
- Hu, Y., & Smyth, G. K. (2009). ELDA: extreme limiting dilution analysis for comparing depleted and enriched populations in stem cell and other assays. *J Immunol Methods*, *347*(1-2), 70-78. doi:10.1016/j.jim.2009.06.008
- Hutter, G., Nowak, D., Mossner, M., Ganepola, S., Mussig, A., Allers, K., . . . Thiel, E. (2009). Long-term control of HIV by CCR5 Delta32/Delta32 stem-cell transplantation. *N Engl J Med*, *360*(7), 692-698. doi:10.1056/NEJMoa0802905
- Imamichi, H., Dewar, R. L., Adelsberger, J. W., Rehm, C. A., O'Doherty, U., Paxinos, E. E., . . . Lane, H. C. (2016). Defective HIV-1 proviruses produce novel protein-coding RNA species in HIV-infected patients on combination antiretroviral therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *113*(31), 8783-8788. doi:10.1073/pnas.1609057113
- Jaafoura, S., de Goer de Herve, M. G., Hernandez-Vargas, E. A., Hendel-Chavez, H., Abdoh, M., Mateo, M. C., . . . Taoufik, Y. (2014). Progressive contraction of the latent HIV reservoir around a core of less-differentiated CD4(+) memory T Cells. *Nat Commun*, *5*, 5407. doi:10.1038/ncomms6407
- Kaplan, R. C., Hanna, D. B., & Kizer, J. R. (2016). Recent Insights Into Cardiovascular Disease (CVD) Risk Among HIV-Infected Adults. *Curr HIV/AIDS Rep*, *13*(1), 44-52. doi:10.1007/s11904-016-0301-4
- Kearns, A., Gordon, J., Burdo, T. H., & Qin, X. (2017). HIV-1-Associated Atherosclerosis: Unraveling the Missing Link. *J Am Coll Cardiol*, *69*(25), 3084-3098. doi:10.1016/j.jacc.2017.05.012
- Keele, B. F., Giorgi, E. E., Salazar-Gonzalez, J. F., Decker, J. M., Pham, K. T., Salazar, M. G., . . . Shaw, G. M. (2008). Identification and characterization of transmitted and early founder virus envelopes in primary HIV-1 infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *105*(21), 7552-7557. doi:10.1073/pnas.0802203105
- Khoury, G., Anderson, J. L., Fromentin, R., Hartogenesis, W., Smith, M. Z., Bacchetti, P., . . . Lewin, S. R. (2016). Persistence of integrated HIV DNA in CXCR3 + CCR6 + memory CD4+ T cells in HIV-infected individuals on antiretroviral therapy. *AIDS*, *30*(10), 1511-1520. doi:10.1097/QAD.0000000000001029
- Khoury, G., Fromentin, R., Solomon, A., Hartogenesis, W., Killian, M., Hoh, R., . . . Lewin, S. R. (2017). Human Immunodeficiency Virus Persistence and T-Cell Activation in Blood, Rectal, and Lymph Node Tissue in Human Immunodeficiency Virus-Infected Individuals

- Receiving Suppressive Antiretroviral Therapy. *J Infect Dis*, 215(6), 911-919. doi:10.1093/infdis/jix039
- Kiselinova, M., De Spiegelaere, W., Buzon, M. J., Malatinkova, E., Lichterfeld, M., & Vandekerckhove, L. (2016). Integrated and Total HIV-1 DNA Predict Ex Vivo Viral Outgrowth. *PLoS Pathog*, 12(3), e1005472. doi:10.1371/journal.ppat.1005472
- Kitahata, M. M., Gange, S. J., Abraham, A. G., Merriman, B., Saag, M. S., Justice, A. C., . . . Investigators, N.-A. (2009). Effect of early versus deferred antiretroviral therapy for HIV on survival. *N Engl J Med*, 360(18), 1815-1826. doi:10.1056/NEJMoa0807252
- Klatzmann, D., Champagne, E., Chamaret, S., Gruest, J., Guetard, D., Hercend, T., . . . Montagnier, L. (1984). T-lymphocyte T4 molecule behaves as the receptor for human retrovirus LAV. *Nature*, 312(5996), 767-768. doi:10.1038/312767a0
- Korber, B., Muldoon, M., Theiler, J., Gao, F., Gupta, R., Lapedes, A., . . . Bhattacharya, T. (2000). Timing the ancestor of the HIV-1 pandemic strains. *Science*, 288(5472), 1789-1796. doi:10.1126/science.288.5472.1789
- Kwong, P. D., Wyatt, R., Robinson, J., Sweet, R. W., Sodroski, J., & Hendrickson, W. A. (1998). Structure of an HIV gp120 envelope glycoprotein in complex with the CD4 receptor and a neutralizing human antibody. *Nature*, 393(6686), 648-659. doi:10.1038/31405
- Larder, B. A., Darby, G., & Richman, D. D. (1989). HIV with reduced sensitivity to zidovudine (AZT) isolated during prolonged therapy. *Science*, 243(4899), 1731-1734. doi:10.1126/science.2467383
- Lee, G. Q., Orlova-Fink, N., Einkauf, K., Chowdhury, F. Z., Sun, X., Harrington, S., . . . Lichterfeld, M. (2017). Clonal expansion of genome-intact HIV-1 in functionally polarized Th1 CD4+ T cells. *J Clin Invest*, 127(7), 2689-2696. doi:10.1172/JCI93289
- Lengauer, T., Sander, O., Sierra, S., Thielen, A., & Kaiser, R. (2007). Bioinformatics prediction of HIV coreceptor usage. *Nat Biotechnol*, 25(12), 1407-1410. doi:10.1038/nbt1371
- Levi, J., Raymond, A., Pozniak, A., Vernazza, P., Kohler, P., & Hill, A. (2016). Can the UNAIDS 90-90-90 target be achieved? A systematic analysis of national HIV treatment cascades. *BMJ Glob Health*, 1(2), e000010. doi:10.1136/bmjgh-2015-000010
- Levy, Y., Lacabaratz, C., Weiss, L., Viard, J. P., Goujard, C., Lelievre, J. D., . . . Delfraissy, J. F. (2009). Enhanced T cell recovery in HIV-1-infected adults through IL-7 treatment. *J Clin Invest*, 119(4), 997-1007. doi:38052 [pii]
- 10.1172/JCI38052
- Leyre, L., Kroon, E., Vandergeeten, C., Sacdalan, C., Colby, D. J., Buranapraditkun, S., . . . Rv254/Search, R. V. S. S. s. g. (2020). Abundant HIV-infected cells in blood and tissues

- are rapidly cleared upon ART initiation during acute HIV infection. *Sci Transl Med*, 12(533). doi:10.1126/scitranslmed.aav3491
- Li, H., Bar, K. J., Wang, S., Decker, J. M., Chen, Y., Sun, C., . . . Shaw, G. M. (2010). High Multiplicity Infection by HIV-1 in Men Who Have Sex with Men. *PLoS Pathog*, 6(5), e1000890. doi:10.1371/journal.ppat.1000890
- Lorenzo-Redondo, R., Fryer, H. R., Bedford, T., Kim, E. Y., Archer, J., Pond, S. L. K., . . . Wolinsky, S. M. (2016). Persistent HIV-1 replication maintains the tissue reservoir during therapy. *Nature*, 530(7588), 51-56. doi:10.1038/nature16933
- Lynch, H. E., Goldberg, G. L., Chidgey, A., Van den Brink, M. R., Boyd, R., & Sempowski, G. D. (2009). Thymic involution and immune reconstitution. *Trends Immunol*, 30(7), 366-373. doi:10.1016/j.it.2009.04.003
- Maldarelli, F., Wu, X., Su, L., Simonetti, F. R., Shao, W., Hill, S., . . . Hughes, S. H. (2014). HIV latency. Specific HIV integration sites are linked to clonal expansion and persistence of infected cells. *Science*, 345(6193), 179-183. doi:10.1126/science.1254194
- Maldonado, G., & Greenland, S. (1993). Simulation study of confounder-selection strategies. *Am J Epidemiol*, 138(11), 923-936. doi:10.1093/oxfordjournals.aje.a116813
- Malim, M. H., & Bieniasz, P. D. (2012). HIV Restriction Factors and Mechanisms of Evasion. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2(5), a006940. doi:10.1101/cshperspect.a006940
- Masur, H., Michelis, M. A., Greene, J. B., Onorato, I., Stouwe, R. A., Holzman, R. S., . . . Cunningham-Rundles, S. (1981). An outbreak of community-acquired *Pneumocystis carinii* pneumonia: initial manifestation of cellular immune dysfunction. *N Engl J Med*, 305(24), 1431-1438. doi:10.1056/NEJM198112103052402
- Mattapallil, J. J., Douek, D. C., Hill, B., Nishimura, Y., Martin, M., & Roederer, M. (2005). Massive infection and loss of memory CD4+ T cells in multiple tissues during acute SIV infection. *Nature*, 434(7037), 1093-1097. doi:10.1038/nature03501
- Mazzucchelli, R., & Durum, S. K. (2007). Interleukin-7 receptor expression: intelligent design. *Nat Rev Immunol*, 7(2), 144-154. doi:10.1038/nri2023
- McGowan, I., Elliott, J., Fuerst, M., Taing, P., Boscardin, J., Poles, M., & Anton, P. (2004). Increased HIV-1 mucosal replication is associated with generalized mucosal cytokine activation. *J Acquir Immune Defic Syndr*, 37(2), 1228-1236. doi:10.1097/01.qai.0000131846.12453.29
- McLaughlin, M. M., Ma, Y., Scherzer, R., Rahalkar, S., Martin, J. N., Mills, C., . . . Hsue, P. Y. (2020). Association of Viral Persistence and Atherosclerosis in Adults With Treated HIV Infection. *JAMA Netw Open*, 3(10), e2018099. doi:10.1001/jamanetworkopen.2020.18099

- Mehandru, S., Poles, M. A., Tenner-Racz, K., Horowitz, A., Hurley, A., Hogan, C., . . . Markowitz, M. (2004). Primary HIV-1 infection is associated with preferential depletion of CD4+ T lymphocytes from effector sites in the gastrointestinal tract. *J Exp Med*, *200*(6), 761-770. doi:10.1084/jem.20041196
- Mehraj, V., Ramendra, R., Isnard, S., Dupuy, F. P., Ponte, R., Chen, J., . . . Aging Cohort Study, G. (2020). Circulating (1->3)-beta-D-glucan Is Associated With Immune Activation During Human Immunodeficiency Virus Infection. *Clin Infect Dis*, *70*(2), 232-241. doi:10.1093/cid/ciz212
- Mendoza, P., Gruell, H., Nogueira, L., Pai, J. A., Butler, A. L., Millard, K., . . . Nussenzweig, M. C. (2018). Combination therapy with anti-HIV-1 antibodies maintains viral suppression. *Nature*, *561*(7724), 479-484. doi:10.1038/s41586-018-0531-2
- Mendoza, P., Jackson, J. R., Oliveira, T. Y., Gaebler, C., Ramos, V., Caskey, M., . . . Cohn, L. B. (2020). Antigen-responsive CD4+ T cell clones contribute to the HIV-1 latent reservoir. *J Exp Med*, *217*(7). doi:10.1084/jem.20200051
- Merino, J., Martinez-Gonzalez, M. A., Rubio, M., Inoges, S., Sanchez-Ibarrola, A., & Subira, M. L. (1998). Progressive decrease of CD8high+ CD28+ CD57- cells with ageing. *Clin Exp Immunol*, *112*(1), 48-51. doi:10.1046/j.1365-2249.1998.00551.x
- Mexas, A. M., Graf, E. H., Pace, M. J., Yu, J. J., Pappasavvas, E., Azzoni, L., . . . O'Doherty, U. (2012). Concurrent measures of total and integrated HIV DNA monitor reservoirs and ongoing replication in eradication trials. *AIDS*, *26*(18), 2295-2306. doi:10.1097/QAD.0b013e32835a5c2f
- Migueles, S. A., Osborne, C. M., Royce, C., Compton, A. A., Joshi, R. P., Weeks, K. A., . . . Connors, M. (2008). Lytic granule loading of CD8+ T cells is required for HIV-infected cell elimination associated with immune control. *Immunity*, *29*(6), 1009-1021. doi:10.1016/j.immuni.2008.10.010
- Migueles, S. A., Sabbaghian, M. S., Shupert, W. L., Bettinotti, M. P., Marincola, F. M., Martino, L., . . . Connors, M. (2000). HLA B*5701 is highly associated with restriction of virus replication in a subgroup of HIV-infected long term nonprogressors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *97*(6), 2709-2714. doi:10.1073/pnas.050567397
- Moir, S., Chun, T. W., & Fauci, A. S. (2011). Pathogenic mechanisms of HIV disease. *Annu Rev Pathol*, *6*, 223-248. doi:10.1146/annurev-pathol-011110-130254
- Mousseau, G., Kessing, C. F., Fromentin, R., Trautmann, L., Chomont, N., & Valente, S. T. (2015). The Tat Inhibitor Didehydro-Cortistatin A Prevents HIV-1 Reactivation from Latency. *mBio*, *6*(4), e00465. doi:10.1128/mBio.00465-15

- Napolitano, L. A., Schmidt, D., Gotway, M. B., Ameli, N., Filbert, E. L., Ng, M. M., . . . McCune, J. M. (2008). Growth hormone enhances thymic function in HIV-1-infected adults. *J Clin Invest*, *118*(3), 1085-1098. doi:10.1172/JCI32830
- Neuhaus, J., Jacobs, D. R., Jr., Baker, J. V., Calmy, A., Duprez, D., La Rosa, A., . . . Neaton, J. D. (2010). Markers of inflammation, coagulation, and renal function are elevated in adults with HIV infection. *J Infect Dis*, *201*(12), 1788-1795. doi:10.1086/652749
- Newman, D. K., Fu, G., McOlash, L., Schauder, D., Newman, P. J., Cui, W., . . . Riese, M. J. (2018). Frontline Science: PECAM-1 (CD31) expression in naive and memory, but not acutely activated, CD8(+) T cells. *J Leukoc Biol*, *104*(5), 883-893. doi:10.1002/JLB.2HI0617-229RRR
- Nixon, C. C., Mavigner, M., Sampey, G. C., Brooks, A. D., Spagnuolo, R. A., Irlbeck, D. M., . . . Garcia, J. V. (2020). Systemic HIV and SIV latency reversal via non-canonical NF-kappaB signalling in vivo. *Nature*, *578*(7793), 160-165. doi:10.1038/s41586-020-1951-3
- Pardons, M., Baxter, A. E., Massanella, M., Pagliuzza, A., Fromentin, R., Dufour, C., . . . Chomont, N. (2019). Single-cell characterization and quantification of translation-competent viral reservoirs in treated and untreated HIV infection. *PLoS Pathog*, *15*(2), e1007619. doi:10.1371/journal.ppat.1007619
- Pardons, M., Fromentin, R., Pagliuzza, A., Routy, J. P., & Chomont, N. (2019). Latency-Reversing Agents Induce Differential Responses in Distinct Memory CD4 T Cell Subsets in Individuals on Antiretroviral Therapy. *Cell Rep*, *29*(9), 2783-2795 e2785. doi:10.1016/j.celrep.2019.10.101
- Peluso, M. J., Bacchetti, P., Ritter, K. D., Beg, S., Lai, J., Martin, J. N., . . . Deeks, S. G. (2020). Differential decay of intact and defective proviral DNA in HIV-1-infected individuals on suppressive antiretroviral therapy. *JCI Insight*, *5*(4). doi:10.1172/jci.insight.132997
- Pereyra, F., Addo, M. M., Kaufmann, D. E., Liu, Y., Miura, T., Rathod, A., . . . Walker, B. D. (2008). Genetic and immunologic heterogeneity among persons who control HIV infection in the absence of therapy. *J Infect Dis*, *197*(4), 563-571. doi:10.1086/526786
- Pettifor, A., MacPhail, C., Corneli, A., Sibeko, J., Kamanga, G., Rosenberg, N., . . . Immunology, N. C. f. H. A. V. (2011). Continued high risk sexual behavior following diagnosis with acute HIV infection in South Africa and Malawi: implications for prevention. *AIDS Behav*, *15*(6), 1243-1250. doi:10.1007/s10461-010-9839-0
- Plana, M., Garcia, F., Darwich, L., Romeu, J., Lopez, A., Cabrera, C., . . . Red de Investigacion en, S. (2011). The reconstitution of the thymus in immunosuppressed individuals restores

- CD4-specific cellular and humoral immune responses. *Immunology*, 133(3), 318-328. doi:10.1111/j.1365-2567.2011.03442.x
- Planas, D., Zhang, Y., Monteiro, P., Goulet, J. P., Gosselin, A., Grandvaux, N., . . . Ancuta, P. (2017). HIV-1 selectively targets gut-homing CCR6+CD4+ T cells via mTOR-dependent mechanisms. *JCI Insight*, 2(15). doi:10.1172/jci.insight.93230
- Popa, C., Netea, M. G., van Riel, P. L., van der Meer, J. W., & Stalenhoef, A. F. (2007). The role of TNF-alpha in chronic inflammatory conditions, intermediary metabolism, and cardiovascular risk. *J Lipid Res*, 48(4), 751-762. doi:10.1194/jlr.R600021-JLR200
- Popper, S. J., Sarr, A. D., Gueye-Ndiaye, A., Mboup, S., Essex, M. E., & Kanki, P. J. (2000). Low plasma human immunodeficiency virus type 2 viral load is independent of proviral load: low virus production in vivo. *J Virol*, 74(3), 1554-1557. doi:10.1128/jvi.74.3.1554-1557.2000
- Procopio, F. A., Fromentin, R., Kulpa, D. A., Brehm, J. H., Bebin, A. G., Strain, M. C., . . . Chomont, N. (2015). A Novel Assay to Measure the Magnitude of the Inducible Viral Reservoir in HIV-infected Individuals. *EBioMedicine*, 2(8), 874-883. doi:10.1016/j.ebiom.2015.06.019
- Ramji, D. P., & Davies, T. S. (2015). Cytokines in atherosclerosis: Key players in all stages of disease and promising therapeutic targets. *Cytokine Growth Factor Rev*, 26(6), 673-685. doi:10.1016/j.cytogfr.2015.04.003
- Richard, J., Veillette, M., Brassard, N., Iyer, S. S., Roger, M., Martin, L., . . . Finzi, A. (2015). CD4 mimetics sensitize HIV-1-infected cells to ADCC. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 112(20), E2687-2694. doi:10.1073/pnas.1506755112
- Richman, D. D., Huang, K., Lada, S. M., Sun, X., Jain, S., Massanella, M., & Menke, B. (2019). Replication competence of virions induced from CD4+ lymphocytes latently infected with HIV. *Retrovirology*, 16(1), 4. doi:10.1186/s12977-019-0466-1
- Roche, M., Tumpach, C., Symons, J., Gartner, M., Anderson, J. L., Khoury, G., . . . Lewin, S. R. (2020). CXCR4-Using HIV Strains Predominate in Naive and Central Memory CD4(+) T Cells in People Living with HIV on Antiretroviral Therapy: Implications for How Latency Is Established and Maintained. *J Virol*, 94(6). doi:10.1128/JVI.01736-19
- Rodriguez-Penney, A. T., Iudicello, J. E., Riggs, P. K., Doyle, K., Ellis, R. J., Letendre, S. L., . . . Group, H. I. V. N. R. P. H. (2013). Co-morbidities in persons infected with HIV: increased burden with older age and negative effects on health-related quality of life. *AIDS Patient Care STDS*, 27(1), 5-16. doi:10.1089/apc.2012.0329

- Rosenberg, E. S., Billingsley, J. M., Caliendo, A. M., Boswell, S. L., Sax, P. E., Kalams, S. A., & Walker, B. D. (1997). Vigorous HIV-1-specific CD4⁺ T cell responses associated with control of viremia. *Science*, *278*(5342), 1447-1450. doi:10.1126/science.278.5342.1447
- Rosenbloom, D. I., Elliott, O., Hill, A. L., Henrich, T. J., Siliciano, J. M., & Siliciano, R. F. (2015). Designing and Interpreting Limiting Dilution Assays: General Principles and Applications to the Latent Reservoir for Human Immunodeficiency Virus-1. *Open Forum Infect Dis*, *2*(4), ofv123. doi:10.1093/ofid/ofv123
- Ross, R. (1999). Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med*, *340*(2), 115-126. doi:10.1056/NEJM199901143400207
- Ryom, L., Lundgren, J. D., El-Sadr, W., Reiss, P., Kirk, O., Law, M., . . . group, D. A. D. s. (2018). Cardiovascular disease and use of contemporary protease inhibitors: the D:A:D international prospective multicohort study. *Lancet HIV*, *5*(6), e291-e300. doi:10.1016/S2352-3018(18)30043-2
- Saleh, S., Wightman, F., Ramanayake, S., Alexander, M., Kumar, N., Khoury, G., . . . Lewin, S. R. (2011). Expression and reactivation of HIV in a chemokine induced model of HIV latency in primary resting CD4⁺ T cells. *Retrovirology*, *8*, 80. doi:10.1186/1742-4690-8-80
- Samji, H., Cescon, A., Hogg, R. S., Modur, S. P., Althoff, K. N., Buchacz, K., . . . Design of Ie, D. E. A. (2013). Closing the gap: increases in life expectancy among treated HIV-positive individuals in the United States and Canada. *PLoS One*, *8*(12), e81355. doi:10.1371/journal.pone.0081355
- Samson, M., Libert, F., Doranz, B. J., Rucker, J., Liesnard, C., Farber, C. M., . . . Parmentier, M. (1996). Resistance to HIV-1 infection in caucasian individuals bearing mutant alleles of the CCR-5 chemokine receptor gene. *Nature*, *382*(6593), 722-725. doi:10.1038/382722a0
- Sanada, F., Taniyama, Y., Muratsu, J., Otsu, R., Shimizu, H., Rakugi, H., & Morishita, R. (2018). Source of Chronic Inflammation in Aging. *Front Cardiovasc Med*, *5*, 12. doi:10.3389/fcvm.2018.00012
- Seddon, B., Tomlinson, P., & Zamoyska, R. (2003). Interleukin 7 and T cell receptor signals regulate homeostasis of CD4 memory cells. *Nat Immunol*, *4*(7), 680-686. doi:10.1038/ni946
- Sereti, I., Dunham, R. M., Spritzler, J., Aga, E., Proschan, M. A., Medvik, K., . . . Team, A. S. (2009). IL-7 administration drives T cell-cycle entry and expansion in HIV-1 infection. *Blood*, *113*(25), 6304-6314. doi:10.1182/blood-2008-10-186601
- Shan, L., Deng, K., Shroff, N. S., Durand, C. M., Rabi, S. A., Yang, H. C., . . . Siliciano, R. F. (2012). Stimulation of HIV-1-specific cytolytic T lymphocytes facilitates elimination of

- latent viral reservoir after virus reactivation. *Immunity*, 36(3), 491-501. doi:10.1016/j.immuni.2012.01.014
- Sharp, P. M., & Hahn, B. H. (2011). Origins of HIV and the AIDS pandemic. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 1(1), a006841. doi:10.1101/cshperspect.a006841
- Siliciano, J. D., Kajdas, J., Finzi, D., Quinn, T. C., Chadwick, K., Margolick, J. B., . . . Siliciano, R. F. (2003). Long-term follow-up studies confirm the stability of the latent reservoir for HIV-1 in resting CD4+ T cells. *Nat Med*, 9(6), 727-728. doi:10.1038/nm880
- Silvestri, G., Sodora, D. L., Koup, R. A., Paiardini, M., O'Neil, S. P., McClure, H. M., . . . Feinberg, M. B. (2003). Nonpathogenic SIV infection of sooty mangabeys is characterized by limited bystander immunopathology despite chronic high-level viremia. *Immunity*, 18(3), 441-452. doi:10.1016/s1074-7613(03)00060-8
- Simonetti, F. R., Sobolewski, M. D., Fyne, E., Shao, W., Spindler, J., Hattori, J., . . . Maldarelli, F. (2016). Clonally expanded CD4+ T cells can produce infectious HIV-1 in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 113(7), 1883-1888. doi:10.1073/pnas.1522675113
- Smith, K., Zheng, L., Bosch, R., Margolis, D. M., Tenorio, A., Napolitano, L., . . . Pollard, R. (2010). Treatment with recombinant growth hormone is associated with modest improvement in CD4 lymphocyte reconstitution in HIV-infected persons on antiretroviral therapy: results of ACTG A5174. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 26(4), 425-432. doi:10.1089/aid.2009.0052
- So-Armah, K. A., Tate, J. P., Chang, C. H., Butt, A. A., Gerschenson, M., Gibert, C. L., . . . Team, V. P. (2016). Do Biomarkers of Inflammation, Monocyte Activation, and Altered Coagulation Explain Excess Mortality Between HIV Infected and Uninfected People? *J Acquir Immune Defic Syndr*, 72(2), 206-213. doi:10.1097/QAI.0000000000000954
- Stover, J., Bollinger, L., Izazola, J. A., Loures, L., DeLay, P., Ghys, P. D., & Fast Track modeling working, g. (2016). What Is Required to End the AIDS Epidemic as a Public Health Threat by 2030? The Cost and Impact of the Fast-Track Approach. *PLoS One*, 11(5), e0154893. doi:10.1371/journal.pone.0154893
- Sun, H., Kim, D., Li, X., Kiselina, M., Ouyang, Z., Vandekerckhove, L., . . . Lichterfeld, M. (2015). Th1/17 Polarization of CD4 T Cells Supports HIV-1 Persistence during Antiretroviral Therapy. *J Virol*, 89(22), 11284-11293. doi:10.1128/JVI.01595-15
- Sundquist, W. I., & Krausslich, H. G. (2012). HIV-1 assembly, budding, and maturation. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2(7), a006924. doi:10.1101/cshperspect.a006924
- Tanaskovic, S., Fernandez, S., Price, P., Lee, S., & French, M. A. (2010). CD31 (PECAM-1) is a marker of recent thymic emigrants among CD4+ T-cells, but not CD8+ T-cells or

- gammadelta T-cells, in HIV patients responding to ART. *Immunol Cell Biol*, 88(3), 321-327. doi:10.1038/icb.2009.108
- Taub, D. D., Murphy, W. J., & Longo, D. L. (2010). Rejuvenation of the aging thymus: growth hormone-mediated and ghrelin-mediated signaling pathways. *Curr Opin Pharmacol*, 10(4), 408-424. doi:10.1016/j.coph.2010.04.015
- Tomiyama, H., Oka, S., Ogg, G. S., Ida, S., McMichael, A. J., & Takiguchi, M. (2000). Expansion of HIV-1-specific CD28- CD45RA- CD8+ T cells in chronically HIV-1-infected individuals. *AIDS*, 14(13), 2049-2051. doi:10.1097/00002030-200009080-00023
- Trautmann, L., Janbazian, L., Chomont, N., Said, E. A., Gimmig, S., Bessette, B., . . . Sekaly, R. P. (2006). Upregulation of PD-1 expression on HIV-specific CD8+ T cells leads to reversible immune dysfunction. *Nat Med*, 12(10), 1198-1202. doi:10.1038/nm1482
- Triant, V. A., Lee, H., Hadigan, C., & Grinspoon, S. K. (2007). Increased acute myocardial infarction rates and cardiovascular risk factors among patients with human immunodeficiency virus disease. *J Clin Endocrinol Metab*, 92(7), 2506-2512. doi:10.1210/jc.2006-2190
- UNAIDS. (2014). *The gap report*. Retrieved from https://www.unaids.org/sites/default/files/media_asset/UNAIDS_Gap_report_en.pdf
- Unids. (2020a). Fact sheet. Retrieved from <https://www.unaids.org/en/resources/fact-sheet>
- UNAIDS. (2020b). *UNAIDS data 2020*. Retrieved from https://www.unaids.org/sites/default/files/media_asset/2020_aids-data-book_en.pdf
- Vandergaeten, C., Fromentin, R., DaFonseca, S., Lawani, M. B., Sereti, I., Lederman, M. M., . . . Chomont, N. (2013). Interleukin-7 promotes HIV persistence during antiretroviral therapy. *Blood*, 121(21), 4321-4329. doi:10.1182/blood-2012-11-465625
- Vandergaeten, C., Fromentin, R., Merlini, E., Lawani, M. B., DaFonseca, S., Bakeman, W., . . . Chomont, N. (2014). Cross-clade ultrasensitive PCR-based assays to measure HIV persistence in large-cohort studies. *J Virol*, 88(21), 12385-12396. doi:10.1128/JVI.00609-14
- Vasto, S., Candore, G., Balistreri, C. R., Caruso, M., Colonna-Romano, G., Grimaldi, M. P., . . . Caruso, C. (2007). Inflammatory networks in ageing, age-related diseases and longevity. *Mech Ageing Dev*, 128(1), 83-91. doi:10.1016/j.mad.2006.11.015
- von Stockenstrom, S., Odevall, L., Lee, E., Sinclair, E., Bacchetti, P., Killian, M., . . . Palmer, S. (2015). Longitudinal Genetic Characterization Reveals That Cell Proliferation Maintains a Persistent HIV Type 1 DNA Pool During Effective HIV Therapy. *J Infect Dis*, 212(4), 596-607. doi:10.1093/infdis/jiv092

- Wagner, T. A., McLaughlin, S., Garg, K., Cheung, C. Y., Larsen, B. B., Styrchak, S., . . . Frenkel, L. M. (2014). HIV latency. Proliferation of cells with HIV integrated into cancer genes contributes to persistent infection. *Science*, *345*(6196), 570-573. doi:10.1126/science.1256304
- Wang, Z., Gurule, E. E., Brennan, T. P., Gerold, J. M., Kwon, K. J., Hosmane, N. N., . . . Siliciano, R. F. (2018). Expanded cellular clones carrying replication-competent HIV-1 persist, wax, and wane. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *115*(11), E2575-E2584. doi:10.1073/pnas.1720665115
- Wei, X., Decker, J. M., Wang, S., Hui, H., Kappes, J. C., Wu, X., . . . Shaw, G. M. (2003). Antibody neutralization and escape by HIV-1. *Nature*, *422*(6929), 307-312. doi:10.1038/nature01470
- WHO. (2020). Number of people (all ages) living with HIV Estimates by WHO region. Retrieved from <https://apps.who.int/gho/data/node.main.620?lang=en>
- Williams, J. P., Hurst, J., Stohr, W., Robinson, N., Brown, H., Fisher, M., . . . Investigators, S. P. (2014). HIV-1 DNA predicts disease progression and post-treatment virological control. *Elife*, *3*, e03821. doi:10.7554/eLife.03821
- Wong, J. K., Hezareh, M., Gunthard, H. F., Havlir, D. V., Ignacio, C. C., Spina, C. A., & Richman, D. D. (1997). Recovery of replication-competent HIV despite prolonged suppression of plasma viremia. *Science*, *278*(5341), 1291-1295. doi:10.1126/science.278.5341.1291
- Worobey, M., Gemmel, M., Teuwen, D. E., Haselkorn, T., Kunstman, K., Bunce, M., . . . Wolinsky, S. M. (2008). Direct evidence of extensive diversity of HIV-1 in Kinshasa by 1960. *Nature*, *455*(7213), 661-664. doi:10.1038/nature07390
- Yang, J., Zhang, L., Yu, C., Yang, X. F., & Wang, H. (2014). Monocyte and macrophage differentiation: circulation inflammatory monocyte as biomarker for inflammatory diseases. *Biomark Res*, *2*(1), 1. doi:10.1186/2050-7771-2-1
- Zhang, Y., Planas, D., Raymond Marchand, L., Massanella, M., Chen, H., Wacleche, V. S., . . . Ancuta, P. (2020). Improving HIV Outgrowth by Optimizing Cell-Culture Conditions and Supplementing With all-trans Retinoic Acid. *Front Microbiol*, *11*, 902. doi:10.3389/fmicb.2020.00902
- Zhang, Z., Schuler, T., Zupancic, M., Wietgreffe, S., Staskus, K. A., Reimann, K. A., . . . Haase, A. T. (1999). Sexual transmission and propagation of SIV and HIV in resting and activated CD4+ T cells. *Science*, *286*(5443), 1353-1357. doi:10.1126/science.286.5443.1353