

Université de Montréal
Faculté de Médecine
Département de Microbiologie et Immunologie

Étude du rôle de l'interleukine-32 dans l'infection à VIH-1

par

N'Guessan Pascale F. Kouassi

Centre de Recherche
du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CRCHUM)

Mémoire présenté à
la Faculté des Études Supérieures en vue de l'obtention du
grade de maîtrise en microbiologie et immunologie

Juillet, 2015

© N'Guessan Pascale F. Kouassi, 2015

Université de Montréal
Faculté des Études Supérieures et Postdoctorales

Ce mémoire intitulé
Étude du rôle de l'interleukine-32 dans l'infection à VIH-1

présenté par
N'Guessan Pascale F. Kouassi

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes:

Éric A. Cohen, Ph.D.
Président-rapporteur

Guy Lemay, Ph.D.
Membre du jury

Cécile Tremblay, MD, FRCPC
Directrice de recherche

Petronela Ancuta, Ph.D.
Co-directrice de recherche

RÉSUMÉ

Les progresseurs lents du VIH-1 sont de rares sujets asymptomatiques pendant plusieurs années sans thérapie antirétrovirale. Parmi ces sujets à progression lente vers le SIDA, il est possible qu'un sous-groupe perde le contrôle de leur infection après plusieurs années de contrôle. Notre laboratoire a analysé l'expression différentielle de différentes protéines et voies moléculaires associées à la perte de contrôle de l'infection: l'interleukine-32 (IL-32) est une cytokine pro-inflammatoire dont le niveau des isoformes alpha et delta a significativement diminué chez les progresseurs lents lors de la perte de contrôle. Par ailleurs, des études antérieures ont attribué, de façon intrigante, à l'IL-32 aussi bien des propriétés anti-VIH-1 que des propriétés immunosuppressives induisant un environnement propice à la réplication du VIH-1.

Ce projet de maîtrise s'est penché sur l'implication de l'IL-32 dans la progression de l'infection à VIH-1 avec un accent particulier sur les progresseurs lents. Nous avons principalement mesuré les niveaux d'IL-32 des sujets séropositifs comparativement aux sujets VIH négatif et estimé les fonctions de cette cytokine à travers des études longitudinales et de corrélation.

Nous avons observé que l'IL-32 total demeure plus élevé chez les séropositifs comparativement aux sujets VIH négatif. Également, l'infection par le VIH-1 entraîne une augmentation du niveau d'IL-32 total. De plus, après une année de thérapie antirétrovirale, les taux plasmatiques d'IL-32 total demeurent significativement plus élevés que ceux des sujets VIH négatif. Comme attendu, le taux d'IL-32 total augmente lors de la perte de contrôle de l'infection chez les progresseurs lents. Une forte concentration plasmatique d'IL-32 total coïncide avec: 1) une augmentation du taux plasmatique de sCD14 et de la cytokine pro-inflammatoire IL-6, 2) une baisse du compte cellulaire CD4 et une augmentation de la charge virale. Un taux plasmatique élevé de CCL5 pourrait prédire une faible concentration d'IL-32 total. L'isoforme alpha de l'IL-32 est plus élevée dans le plasma des sujets VIH négatif tandis que l'IL-32 gamma semble induire un environnement pro-inflammatoire et immunosuppressif.

Il ressort à l'issue de ces observations que l'augmentation de l'IL-32 total est associée à la progression de l'infection à VIH-1 et pourrait constituer un biomarqueur permettant d'apprécier le pronostic de cette infection.

Mots clés: VIH-1, progresseurs lents, Interleukine-32, sCD14, IL-6, CCL5, IL-10.

ABSTRACT

HIV-1 slow progressors constitute a rare population of subjects who remain asymptomatic for many years without antiretroviral therapy. Among this population, some individuals will lose control of their infection after several years of immunological control. Our laboratory has analyzed the differential expression profile of various proteins and molecular pathways associated with the loss of control of HIV infection. The pro-inflammatory cytokine interleukin-32 alpha and delta isoforms significantly decreased in slow progressors as they were losing control of their infection. Furthermore, previous studies have attributed to IL-32 both antiviral property against HIV-1 and immunosuppressive properties that can induce an environment conducive to HIV-1 replication.

This project addresses the role of IL-32 in HIV-1 disease progression with a particular emphasis on slow progressors. We compared the levels of IL-32 in HIV-1 positive versus HIV-1 negative subjects and evaluated the role of this cytokine using longitudinal studies.

We observed that levels of IL-32 remains higher in HIV-positive compared to HIV-negative subjects. Also, HIV-1 infection leads to increased level of IL-32. In addition, after one year of antiretroviral therapy, IL-32 plasma levels remain significantly higher than those of HIV-negative subjects. As expected, the levels of IL-32 increased as slow progressors lost control of their infection. A high plasma concentration of IL-32 predicts: 1) an increase in plasma levels of sCD14 as well as pro-inflammatory cytokine IL-6, 2) a decrease in CD4 cell count and an increase in viral load. High plasma CCL5 predicted a low concentration of IL-32. The alpha isoform of IL-32 is elevated in the plasma of HIV negative subjects while IL-32 gamma appears to induce a pro-inflammatory and immunosuppressive environment. We conclude that increased IL-32 levels are associated with progression of HIV-1 disease and could be used as a biomarker for assessing HIV-1 prognosis.

Keywords: HIV-1, slow progressors, interleukin-32, sCD14, IL-6, CCL5, IL-10

TABLE DES MATIERES

| | |
|--|------|
| Résumé | iii |
| Liste des tableaux | viii |
| Liste des Figures..... | ix |
| Liste des abréviations | xi |
| Remerciements | xiii |
| 1. Introduction | 1 |
| 1.1. Épidémiologie de l'infection à VIH-SIDA..... | 1 |
| 1.2. Histoire de la découverte du VIH..... | 1 |
| 1.3. Caractéristiques générales du VIH..... | 2 |
| 1.4. Génome du VIH-1..... | 3 |
| 1.4.1. Gènes structuraux | 4 |
| 1.4.2. Gènes auxiliaires | 4 |
| 1.5. Cellules cibles du VIH-1..... | 5 |
| 1.6. Cycle de réplication du VIH-1..... | 6 |
| 1.6.1. Phase précoce..... | 6 |
| 1.6.2. Phase tardive..... | 7 |
| 1.7. Pathogénèse du VIH-1..... | 7 |
| 1.7.1. Phases cliniques..... | 7 |
| 1.7.1.1. Phase aiguë..... | 8 |
| 1.7.1.2. Phase chronique..... | 9 |
| 1.7.1.3. Phase SIDA..... | 9 |
| 1.7.2. Réponse immunitaire contre le VIH-1..... | 10 |
| 1.7.2.1. Réponse immunitaire innée..... | 10 |
| 1.7.2.2. Réponse immunitaire adaptative..... | 11 |
| 1.7.2.2.1. Les lymphocytes T CD4+ spécifiques au VIH-1..... | 11 |
| 1.7.2.2.2. Les lymphocytes T CD8+ spécifiques au VIH-1..... | 12 |
| 1.7.2.2.3. Les lymphocytes B..... | 13 |
| 1.8. Traitement de l'infection à VIH-1..... | 14 |
| 1.9. Obstacles de la thérapie anti-VIH-1..... | 15 |
| 1.10. Individus séropositifs à progression lente vers le SIDA..... | 15 |

| | |
|---|----|
| 1.10.1. Progresseurs lents et contrôleurs élites | 15 |
| 1.10.2. Facteurs contribuant à la progression lente..... | 16 |
| 1.10.2.1. Virus atténué..... | 16 |
| 1.10.2.2. Facteurs génétiques de l'hôte..... | 16 |
| 1.10.2.3. Facteurs immunologiques..... | 17 |
| 1.10.2.3.1. Immunité innée..... | 17 |
| 1.10.2.3.2. Lymphocytes T CD4+..... | 18 |
| 1.10.2.3.3. Lymphocytes T CD8+..... | 19 |
| 1.11. Interleukine-32..... | 20 |
| 1.11.1. Identification de l'interleukine-32..... | 20 |
| 1.11.2. Isoformes de l'IL-32..... | 21 |
| 1.11.3. Mécanismes d'induction et fonctions de l'IL-32..... | 22 |
| 1.11.4. Rôles et implications de l'IL-32 dans différentes pathologies..... | 23 |
| 1.11.5. IL-32 et infection à VIH-1..... | 25 |
| 2. Hypothèse et objectifs..... | 28 |
| 3. Matériels et méthodes..... | 30 |
| 3.1. Population d'étude et spécimens biologiques..... | 30 |
| 3.2. Analyse par puces à ADN..... | 32 |
| 3.3. Mise en culture des PBMC..... | 33 |
| 3.4. Infection <i>in vitro</i> par le VIH-1..... | 33 |
| 3.5. Technique de Bradford..... | 34 |
| 3.6. Technique ELISA..... | 34 |
| 3.7. Isolation des cellules T CD4+ et stimulation..... | 36 |
| 3.8. Technique <i>Multiplex Bead Array</i> | 37 |
| 3.9. Statistiques..... | 37 |
| 4. Résultats..... | 38 |
| 4.1. Analyse par puces à ADN..... | 38 |
| 4.2. Taux d'IL-32 total chez des progresseurs lents et après la perte de contrôle. | 39 |
| 4.3. Isoforme alpha de l'interleukine-32..... | 41 |
| 4.4. Comparaison des taux d'interleukine-32 total des séropositifs et VIH négatif..... | 42 |
| 4.5. Suivi du taux d'interleukine-32 total suite à l'infection par le VIH-1..... | 44 |

| | |
|--|-----|
| 4.5.1. Infection <i>in vitro</i> de PBMC..... | 44 |
| 4.5.2. Infection <i>in vivo</i> | 45 |
| 4.6. Évaluation du rôle de l'interleukine-32 dans la progression de l'infection à VIH-1... | 47 |
| 4.6.1. Interleukine-32 et la charge virale..... | 47 |
| 4.6.2. Interleukine-32 et compte cellulaire CD4..... | 49 |
| 4.6.3. Interleukine-32 et facteurs d'inflammation..... | 50 |
| 4.6.3.1. Interleukine-32 et interleukine-6..... | 50 |
| 4.6.3.2. Interleukine-32 et CD14 soluble..... | 53 |
| 4.6.4. Corrélation entre l'interleukine-32 et CCL5..... | 55 |
| 4.7. Induction d'un milieu pro-inflammatoire par l'isoforme gamma..... | 56 |
| 5. Discussion..... | 58 |
| 6. Conclusions-perspectives..... | 63 |
| 7. Références..... | 64 |
| 8. Annexes..... | xiv |

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I: Caractéristiques cliniques des donneurs VIH positif (contrôleurs élités et donneurs virémiques) et VIH négatif.....30

Tableau II: Caractéristiques cliniques des donneurs VIH positif (en primo-infection et un an après la thérapie antirétrovirale) et VIH négatif.....31

Tableau III: Caractéristiques cliniques à l'inclusion des progresseurs lents subdivisés en sous-groupes.....31

LISTE DES FIGURES

| | |
|---|----|
| Figure 1. Structure et morphologie du VIH..... | 3 |
| Figure 2. Structure de l'ADN proviral du VIH-1..... | 4 |
| Figure 3. Cycle de réplication du VIH-1..... | 6 |
| Figure 4. Phases cliniques de l'infection par VIH-1..... | 8 |
| Figure 5. Principales isoformes de l'IL-32 (IL-32 α , IL-32 β , IL-32 γ , IL-32 δ)..... | 21 |
| Figure 6. Épissage de IL-32 γ générant des isoformes (IL-32 α , IL-32 β) à propriétés proinflammatoires amoindries..... | 22 |
| Figure 7. Rôle de l'IL-32 intracellulaire dans la mort cellulaire..... | 24 |
| Figure 8. Modèle d'inhibition de la réplication du VIH par l'IL-32 intracellulaire..... | 26 |
| Figure 9. Analyse par puces à ADN de PBMC de 5 progressseurs lents | 39 |
| Figure 10. Le taux d'IL-32 total augmente lors de la perte de contrôle de l'infection à VIH-1.. | 40 |
| Figure 11. Le taux plasmatique d'IL-32 α mesuré chez les sujets VIH négatif est significativement plus élevé que celui des sujets VIH positif | 41 |
| Figure 12. Le taux de l'IL-32 total est plus élevé chez les sujets VIH positif par rapport à celui des sujets VIH négatif. | 43 |
| Figure 13. L'infection par le VIH induit l'augmentation de l'IL-32 total. | 45 |
| Figure 14. Suivi du taux d'IL-32 total dans le plasma chez un groupe de sujets VIH positif en | |

primo-infection, un an après la thérapie antirétrovirale en comparaison avec des sujets VIH négatif.....46

Figure 15. L'augmentation du taux plasmatique d'IL-32 total est associée à une augmentation de la charge virale.48

Figure 16. L'augmentation de l'IL-32 total plasmatique pourrait prédire une chute du compte cellulaire CD4.....50

Figure 17. L'augmentation de l'IL-32 total plasmatique est associée à une augmentation de l'IL-6.....52

Figure 18. Corrélation entre les taux plasmatiques d'IL-32 total et sCD14.....54

Figure 19. Un taux plasmatique élevé de CCL5 pourrait prédire une faible concentration plasmatique d'IL-32.....56

Figure 20. L'IL-32 γ contrairement à l'IL-32 α est associée à une augmentation du niveau d'inflammation57

LISTE DES ABREVIATIONS

ADCC, *Antibody-dependent cellular cytotoxicity*

ADN, acide désoxyribonucléique

APOBEC3, *Apoplipoprotein B mRNA-editing, enzyme-catalytic, polypeptide-like 3*

ARN, acide ribonucléique

ARNm, ARN messenger

BSA, *Bovine Serum Albumin*

BST-2, Bone marrow stromal cell antigen 2

CCR, *Chemokine C-C motif Receptor*

CMH, Complexe majeur d'histocompatibilité

CTLA-4, *Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4*

CXCR, *Chemokine C-X-C motif Receptor*

ELISA, *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*

FBS, *Fetal Bovine Serum*

FcR, *Fc Receptor*

HNP, *Human neutrophil peptides*

HRP, *Horseradish-peroxydase*

HTLV, *Human T-Lymphotropic Virus*

IDO, *Indoleamine 2,3-Dioxygenase*

IFN, interféron

IL, interleukine

ILT4, *Ig-like transcript 4*

IRF, *Interferon Regulatory Factors*

ISGs, *interferon-stimulated genes*

LAV, *Lymphadenopathy-Associated Virus*

LPS, lipopolysaccharides

LTR, *Long Terminal Repeat*

Nef, *Negative factor*

NK, *Natural killer*

NOD, *Nucleotide-binding oligomerization domain*

ONUSIDA, Programme commun des nations unies pour le VIH/SIDA

PAMP, *Pathogen-associated molecular patterns*
PBMC, *Peripheral Blood Mononuclear Cells*
PBS, *Phosphate-Buffered Saline*
PD-1, *Programmed cell death-1*
PPR, *Pattern recognition receptors*
rev, «Régulateur de l'expression des gènes viraux»
SIDA, *Syndrome d'immunodéficience acquise*
SiRNA, *Small interfering RNA*
Tat, *Trans-Activator of Transcription*
TCR, *T cell receptor*
TLR, *Toll like receptor*
TNF, *Tumor necrosis factor*
TRIM 5 α , *Tripartite Motif-containing protein 5, isoform alpha*
Vif, *Viral Infectivity Factor*
VIH, *Virus de l'immunodéficience humaine*
VIS, *Virus de l'immunodéficience simienne*
Vpr, *Viral Protein R*
Vpu, *Viral protein U*

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier ma directrice de recherche Dre Cécile Tremblay pour l'opportunité qu'elle m'a offerte d'apprendre à ses côtés en m'acceptant sans hésiter au sein de son laboratoire de recherche. Bénéficier entre autres de son expérience, son assistance, sa direction et de ses conseils tout au long de mon projet, ont constitué pour moi un véritable privilège. Les expériences acquises durant mes travaux de recherche m'ont permis de développer des atouts pour un avenir professionnel réussi.

Je remercie ma co-directrice Dre Petronela Ancuta, pour sa disponibilité infaillible, pour tous ses conseils et son soutien constant. Je remercie également tous les membres de son laboratoire qui n'ont pas cessé un instant de me faire bénéficier de leur expertise.

Je remercie tous les membres de mon laboratoire. Dre Annie Chamberland, toujours disponible, qui m'a accueillie dès mon arrivée au laboratoire. Un grand merci à Mohamed Sylla, auprès de qui j'ai appris mes premières techniques. Dre Odalis Milan, qui m'a fait bénéficier de ses précieux conseils. Je remercie Dr Mohamed El-Far entre autres, pour m'avoir fait bénéficier de son savoir, pour son soutien indéfectible, ses conseils et sa disponibilité.

Je remercie tous les donneurs VIH positif et VIH négatif qui ont permis la réalisation de cette étude par le don de leur sang.

Je remercie infiniment toute ma famille, particulièrement mes parents pour leurs conseils, leur assistance permanente, pour l'éducation qu'ils m'ont donnée. Je leur dis merci pour leur présence constante dans ma vie et d'avoir développer en moi cette envie de toujours chercher plus loin.

1. INTRODUCTION

1.1. Épidémiologie de l'infection à VIH-SIDA

Selon le rapport mondial ONUSIDA 2014 (1), 35 millions de personnes vivaient avec le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) en 2013. Ce taux ne peut être augmenté car plus de personnes ont accès à la thérapie antirétrovirale (1). En effet, des données encourageantes révèlent une diminution de 33% du nombre de nouvelles infections passant de 3,4 millions en 2001 à 2,1 millions en 2013 (1). Également, le nombre de décès liés au Syndrome de l'Immunodéficience Acquis (SIDA) est passé de 2,0 millions en 2001 à 1,5 millions en 2013. Malgré toutes ces avancées remarquables, de nombreux efforts restent à fournir pour venir à bout de l'infection à VIH. Par exemple des études récentes, dans plusieurs pays d'Afrique subsaharienne, qui regroupent presque 70% du nombre total des nouvelles infections, ont montré une réduction de l'usage du préservatif combinée ou non avec une augmentation du nombre de partenaires sexuels (1). Également, plusieurs personnes infectées par le VIH ne disposent pas de la thérapie antirétrovirale. Toujours en Afrique subsaharienne, seulement 37% des personnes infectées ont accès à la médication antirétrovirale (1).

1.2. Histoire de la découverte du VIH

Le VIH appartient à la famille des *Retroviridae* (Rétrovirus) et au genre *Lentivirus* (2). Il induit une infection lente, chronique et persistante. Le VIH est l'agent causal du syndrome de l'immunodéficience acquise (SIDA), une maladie dégénérative du système immunitaire et du système nerveux central. Cette affection est principalement caractérisée par une déplétion progressive du taux circulant de lymphocytes T CD4+ jusqu'en dessous de 200 cellules/ μ L, correspondant à l'apparition du SIDA. Le sujet est alors susceptible à plusieurs autres pathologies dites opportunistes pouvant entraîner le décès en cas de non traitement (2).

En 1981, des médecins aux États-Unis rapportent une incidence élevée du sarcome de Kaposi et des infections à *Pneumocystis jirovecii* associée à une réduction du nombre de lymphocytes T CD4+ chez un groupe de sujets homosexuels. On identifie un syndrome d'immunodéficience acquise. Le virus en cause est isolé en 1983 à l'Institut Pasteur de Paris, en France par le groupe

du docteur (Dr) Luc Montagnier. Cette découverte a valu à ce dernier, avec le Dr Françoise Barré-Sinoussi (qui travaillait alors dans l'équipe du Dr Montagnier), le prix Nobel de médecine en 2008. Le virus du SIDA est alors associé à un rétrovirus de la famille des HTLV (*Human T-Lymphotropic Virus*) (3). Des résultats semblables sont également relevés par le groupe de Robert C. Gallo aux États-Unis. En 1984, le groupe du Dr Luc Montagnier nomme le virus du SIDA, LAV (*Lymphadenopathy-Associated Virus*) et publie la séquence de son génome (4). De son côté, le groupe de Robert C. Gallo donne le nom de HTLV III au virus du SIDA (5). C'est finalement en 1986, que la dénomination VIH est recommandé par le comité international sur la taxonomie des virus (6).

1.3. Caractéristiques générales du VIH

Le VIH est un rétrovirus d'environ 100 nm de diamètre. Les virions relâchés lors de la réplication virale ont une enveloppe constituée d'une double couche phospholipidique externe dérivée de la membrane de la cellule infectée. Les protéines d'enveloppe sont composées de la glycoprotéine transmembranaire gp41 qui est liée de manière covalente à la glycoprotéine de surface gp120. Le complexe gp41 et gp120 se retrouve sous forme de trimère à la surface du virus. La matrice est constituée de la protéine p17. À l'intérieur de la matrice se trouve la capsidie composée de plusieurs copies de la protéine p24. Cette capsidie renferme la nucléocapsidie ainsi que le génome viral constitué de deux copies d'ARN simple brin à polarité positive (figure 1). Des enzymes sont également retrouvées dans les particules virales à savoir la transcriptase inverse impérative pour la rétro-transcription de l'ARN en ADN double brin et l'intégrase nécessaire à l'intégration de l'ADN proviral dans le génome de la cellule infectée. Il faut noter également la présence des protéases nécessaire à la maturation des protéines virales (7).

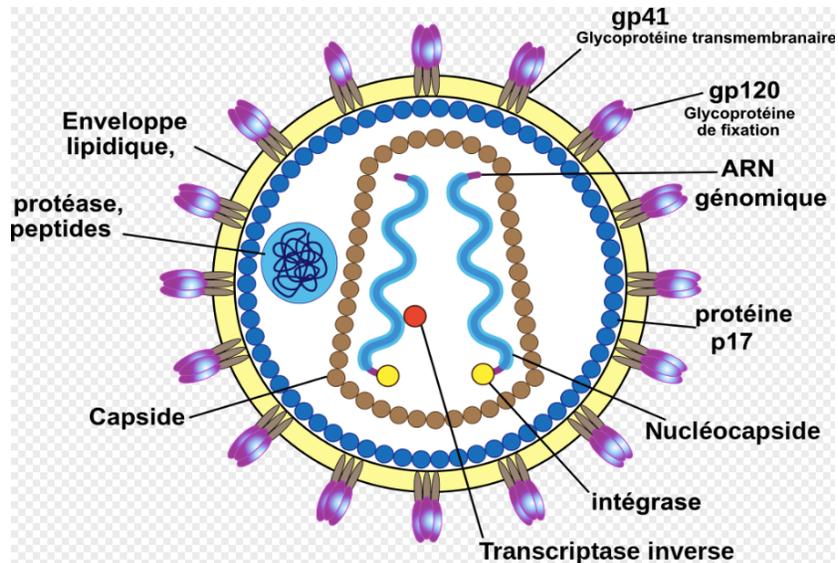


Figure 1. Structure et morphologie du VIH. Adapté de Greene et al. (11) et reproduit avec la permission de Nature Publishing Group: Nature Medicine, copyright 2002.

La diversité génétique et la pathogénicité permettent de diviser le VIH en deux types: le VIH-1 et le VIH-2. Le VIH-2, peu fréquent et moins pathogène est génétiquement très proche du virus de l'immunodéficience simienne (VIS) des mangabeys enfumés. Au contraire, le VIH-1 beaucoup plus pathogène et responsable de la pandémie du VIH aurait pour progéniteur le VIS des chimpanzés (8). Le VIH-1 renferme quatre groupes: le groupe M (Major) qui occasionne 90% des infections et est présent sur tous les continents tandis que les groupes O (*Outlier*), Non O non M et P qui sont seulement représentés au Cameroun, Afrique centrale (9). Le groupe M est composé de neuf sous-types majeurs (A, B, C, D, F, G, H, J et K), le sous-type B est le plus rencontré en Amérique. Des combinaisons sont possibles entre les sous-types du groupe M donnant naissance à des formes recombinantes circulantes appelées *CRFs* (*circulating recombinant forms*). Il existe à ce jour plus de 70 *CRFs* (10).

1.4. Génome du VIH-1

Trois gènes structuraux nommés *gag* (antigène de groupe), *pol* (polymérase) et *env* (enveloppe), de même que des gènes qualifiés d'auxiliaires incluant les gènes régulateurs: *tat* et *rev* et les gènes accessoires: *vif*, *vpr*, *vpu* et *nef* sont encodés par le génome du VIH-1 long d'environ 9.2kb. L'ADN proviral est flanqué à chaque extrémité d'une séquence U3-R-U5

identique appelée LTR (*Long Terminal Repeat*) (Figure 2) contrôlant d'une part la transcription virale et d'autre part l'intégration de l'ADN proviral dans le génome de la cellule infectée par interaction avec l'intégrase virale (11).

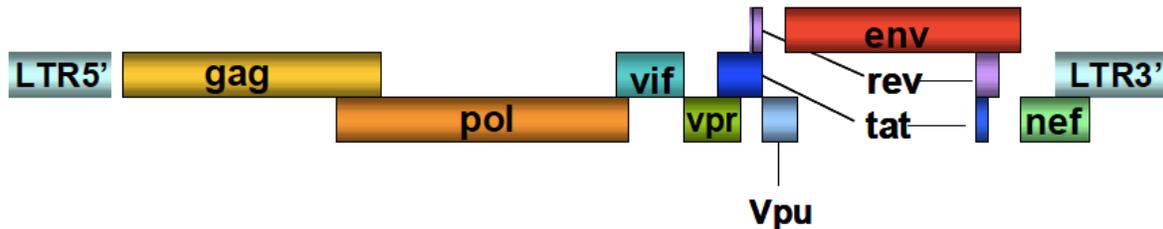


Figure 2. Structure de l'ADN proviral du VIH-1. Adapté de Di Nunzio et al. (12). et reproduit avec la permission de Elsevier: Vaccine, copyright 2012.

1.4.1. Gènes structuraux

Les protéines de la nucléocapside, les enzymes virales et les protéines de surface sont codés respectivement par les gènes de structure *gag*, *pol* et *env*. Le précurseur polyprotéique traduit par le gène *gag* est clivé en protéine de la matrice (p17), de la capsid (p24), de la nucléocapside (p7) et en protéine p6 participant au bourgeonnement des virions (13). Le gène *pol* code pour des enzymes incontournables pour la réplication virale. La transcriptase inverse, obligatoire pour la rétro-transcription de l'ARN viral en ADN qui est ensuite intégré dans le génome de la cellule infectée à l'aide de l'intégrase virale. La protéase virale permet le clivage des polyprotéines en protéines fonctionnelles, essentielles à la maturation du virion. Finalement, la polyprotéine précurseur gp160 provient du gène *env*. la gp160 est clivée en glycoprotéines de membrane gp120 et gp41 grâce à une protéase cellulaire nommée furine (11, 14).

1.4.2. Gènes auxiliaires

Le génome du VIH est également composé de gènes dits accessoires et de gènes régulateurs (206).

Les gènes accessoires sont constitués des protéines *vif*, *vpr*, *vpu* et *nef*. La protéine Vif (*Viral Infectivity Factor*) induit la dégradation d'APOBEC 3F/G exerçant son activité antivirale

en s'incorporant dans l'ADN viral (15). Vpu (*Viral protein U*) est une protéine spécifique au VIH-1 qui facilite la dégradation de la molécule CD4 dans le réticulum endoplasmique. Également, Vpu, en réduisant la quantité de la protéine Tetherin (BST-2) au niveau de la membrane cellulaire faciliterait la relâche des nouveaux virions dans le milieu extracellulaire (16, 17). La protéine Vpr (*Viral Protein R*) favorise la réplication du virus en permettant l'acheminement vers le noyau du complexe de pré-intégration viral, la transactivation des gènes cellulaires ainsi que la différenciation cellulaire (18, 19). La protéine Nef demeure la plus immunogène des protéines accessoires et est indispensable à la réplication virale *in vivo* et à l'évolution de la pathologie (15, 20).

Les gènes régulateurs du VIH sont *tat* (transactivateur transcriptionnel) et *rev* (Régulateur de l'expression des gènes viraux) (21, 22). *Tat* permet la transactivation de la transcription de l'ARN messager (ARNm) et *rev* assure le transport vers le cytoplasme des précurseurs protéiques Gag, Gag-Pol et Env issus de la transcription des ARNm non épissés et mono-épissés. La protéine *rev* permet également la stabilisation et la traduction de l'ARNm (18, 23).

1.5. Cellules cibles du VIH-1

L'entrée du virus dans la cellule nécessite la fixation de la gp120 à la molécule CD4 qui représente le récepteur principal du VIH-1 (24, 25). Par conséquent, toutes les cellules portant à leur surface le marqueur CD4 constituent des cellules cibles, principalement les lymphocytes T CD4+. Le VIH peut cibler aussi les macrophages, les monocytes et les cellules dendritiques (26). Les lymphocytes T CD4+ sont incontournables dans la réponse immunitaire adaptative pendant que les monocytes, macrophages et cellules dendritiques constituent des cellules présentatrices d'antigènes et interviennent dans la réponse immunitaire innée et adaptative (27). L'identification des corécepteurs majeurs CCR5 et CXCR4 indispensables à l'entrée du virus dans la cellule a permis la classification des souches virales: les souches de type R5 utilisent le corécepteur CCR5, les souches X4 se servent du corécepteur CXCR4 et les souches à double tropismes R5/X4 utilisent les deux molécules (28-31). Les souches R5 infectent aussi bien les macrophages que les cellules T CD4+ activées, tandis que les souches X4 interviennent en général tardivement dans la progression de l'infection avec la capacité d'infecter les lymphocytes T CD4+ naïves signant un

mauvais pronostic de la maladie (32).

1.6. Cycle de réplication du VIH-1

Le cycle de réplication du VIH-1 peut être divisé en deux étapes principales (figure 3): la phase précoce allant de l'attachement du virus à la cellule cible jusqu'à l'intégration de l'ADN proviral dans le génome de la cellule infectée, et la phase tardive regroupant la régulation de l'expression de l'ADN proviral, la maturation et le bourgeonnement des virions (33).

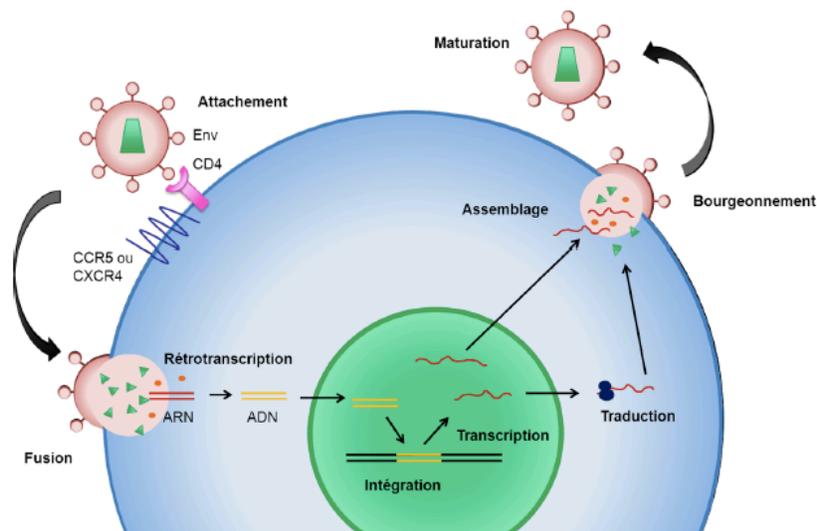


Figure 3. Cycle de réplication du VIH-1. Adapté de Engelman A. et al. (45) et reproduit avec la permission de Nature Publishing Group: Nature Reviews Microbiology, copyright 2012.

1.6.1. Phase précoce

Au début, l'attachement se fait par une interaction entre la gp120 et la molécule CD4 (34, 35). Il s'en suit un changement conformationnel de la gp120 qui expose un site de fixation au corécepteur CCR5 ou CXCR4. L'interaction avec le corécepteur induit un nouveau changement de conformation permettant la mise en évidence de la glycoprotéine transmembranaire gp41 (36, 37). La fusion des deux membranes virale et cellulaire est faite à l'issue du replie sur elles-mêmes des deux hélices de la gp41. La nucléocapside, alors, dans le cytoplasme cellulaire libère après décapsidation les deux exemplaires du même brin d'ARN du virus ainsi que d'autres enzymes

virales (38-40). À l'aide de la transcriptase inverse, l'ARN est retrotranscrit en ADN avec comme particularité l'incorporation de plusieurs d'erreurs entraînant une grande variabilité génétique du virus (41). Le complexe de pré-intégration est finalement composé de l'ADN double brin généré, de l'intégrase, de la protéine Vpr et d'autres protéines cellulaires. Ce complexe est acheminé activement vers le noyau. Le génome viral est intégré dans le génome cellulaire grâce à l'intégrase formant ainsi le provirus (42).

1.6.2. Phase tardive

La phase tardive est amorcée par la transcription des ARNm par l'ARN polymérase cellulaire. Ils sont par la suite épissés ou non et transportés vers le cytoplasme où ils sont traduits par les ribosomes. La protéine Nef et les protéines de régulation *tat* et *rev* sont d'abord synthétisées à partir des petits ARNm épissés. Ensuite, la protéine *rev* assure l'exportation des trois précurseurs protéiques Gag, Gag-Pol et Env (gp160) issus de la transcription des ARNm non épissés et mono-épissés (Env). Les précurseurs Gag, Gag-Pol et gp160 sont successivement traduits. Les virions sont formés par l'association des protéines virales et l'ARN intégral viral. Lors du bourgeonnement, les virions emportent avec eux un fragment de la membrane cellulaire à laquelle sont intégrées les protéines virales membranaires. Les virions deviennent finalement matures par l'action des protéases virales qui terminent le clivage des précurseurs protéiques non clivés (43, 44).

1.7. Pathogénèse du VIH-1

1.7.1. Phases cliniques

L'infection par le VIH-1 est majoritairement caractérisée par une déplétion du nombre de lymphocytes T CD4+. Il en résulte un affaiblissement du système immunitaire augmentant la vulnérabilité aux infections dites opportunistes, ce qui entraîne la mort du sujet infecté.

L'évolution de la maladie peut être divisée en trois phases: la phase aiguë, la phase chronique et la phase SIDA (figure 4).

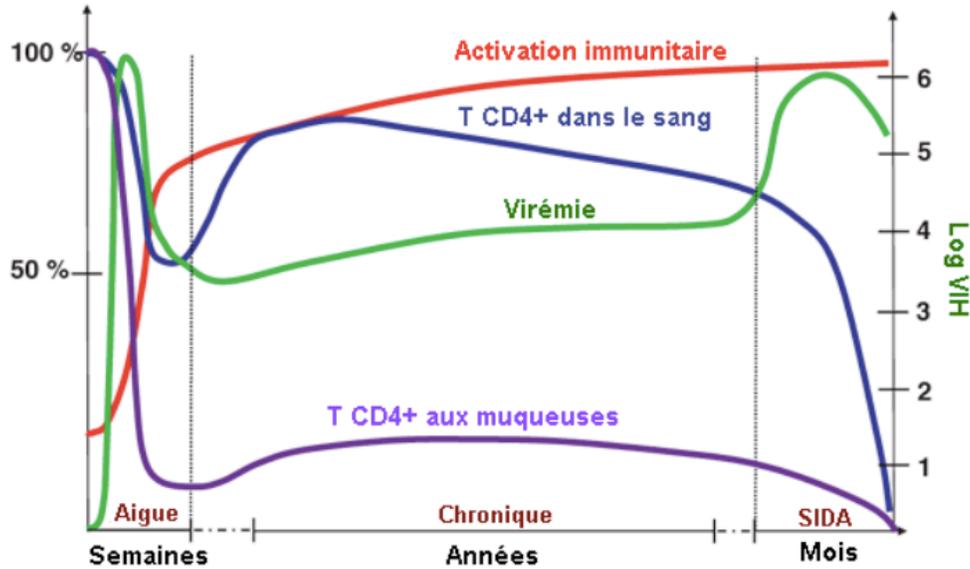


Figure 4. Phases cliniques de l'infection à VIH-1. Adapté de Grossman et al. (46) et reproduit avec la permission de Nature Publishing Group: Nature Medicine, copyright 2006.

1.7.1.1. Phase aigue

La primo-infection par le VIH-1 dure quelques semaines avec une forte réplication virale et une chute du taux de lymphocytes T CD4+ aussi bien au niveau périphérique que dans les muqueuses (46). La symptomatologie de cette phase est habituellement caractérisée, entre autres, par des céphalées, une asthénie, de la fièvre et une perte de poids (47). L'infection aigue est asymptomatique dans près de 50% des cas. La plupart des souches virales retrouvées durant la phase aigue sont à tropisme R5 (48, 49). Ainsi, la majorité des cellules infectées sont les lymphocytes T CD4+CCR5+ activées. En effet, ces cellules expriment les marqueurs d'activation tels que CD25, CD69, HLA-DR; également, les protéines virales à savoir *nef*, *tat*, *rev*, *env* contribuent à l'état d'activation de ces cellules qui se poursuit durant les phases suivantes de l'infection. Plus de la moitié des lymphocytes T CD4+ sont localisés au niveau des tissus lymphoïdes associés au tractus gastro-intestinal et 50% d'entre elles expriment le marqueur CCR5 à l'opposé de 15% dans le sang périphérique et les ganglions lymphatiques (46, 50, 51). Le déclin du taux de cellules T CD4+ CCR5+ dans les muqueuses est dû à une cytolysse issue soit de l'infection de la cellule, soit de l'action des cellules NK (*Natural Killer*) et des lymphocytes T cytotoxiques CD8+ (50, 52). En outre, il a été démontré dans une étude récente qu'au cours de

l'infection par le VIH-1, la mort de la majeure partie des cellules T CD4+, soit environ 95% des cellules localisées dans les tissus lymphoïdes, est due au phénomène de pyroptose (211). La pyroptose est une forme intensément inflammatoire de la mort cellulaire programmée au cours de laquelle plusieurs cytokines proinflammatoires sont libérées y compris l'interleukine-1 β . Ainsi, les cellules T CD4+ en mourant libèrent des cytokines pro-inflammatoires créant un environnement favorable à la mort des cellules environnantes. La pyroptose est médiée par la caspase 1 et est déclenchée dans les cellules suite à une infection virale non productive (211). La réaction immunitaire engendrée au cours de la phase aiguë entraîne une baisse de la réplication virale et un rétablissement partiel du taux de lymphocytes TCD4+ périphérique mais pas dans les muqueuses ou les ganglions (46).

1.7.1.2. Phase chronique

La phase chronique est asymptomatique et dure généralement plusieurs années. Elle se caractérise principalement par une diminution lente du taux de lymphocytes T CD4+ et une réplication virale en bruit de fond (46). Le système immunitaire étant compromis, il en résulte une translocation microbienne au niveau du tractus gastro-intestinal, caractérisée par l'augmentation du taux de sCD14 (CD14 soluble), ce qui alimente l'activation progressive du système immunitaire (53) déjà entamée depuis la phase aiguë de l'infection. Plusieurs cytokines pro-inflammatoires sont alors produites. Ainsi, la déplétion massive du taux de lymphocytes T CD4+ ne pourrait être uniquement attribuée à l'infection cellulaire mais surtout à l'épuisement du métabolisme des cellules de l'immunité (54).

1.7.1.3. Phase SIDA

Le stade SIDA constitue la phase terminale de l'infection à VIH-1. Le taux de lymphocytes T CD4+ devient inférieur à 200 cellules/ μ L (55). Le rebond de la charge virale est accompagné d'une activation accrue du système immunitaire (46). À ce stade, il y a un changement du tropisme de CCR5 à CXCR4 chez certains sujets, quoique cela puisse se faire tout au long de l'infection (50). Ces souches X4, plus sensibles à l'immunité antivirale, apparaissent toutefois à un moment où la défense immunitaire est complètement affaiblie (46). Le

patient est vulnérable à des pathogènes dits opportunistes qui ne seraient pas en mesure d'infecter un sujet immunocompétent. Les maladies opportunistes rencontrées à la phase SIDA peuvent être d'origine fongique, virale, bactérienne ou parasitaires. Il est également possible d'observer des néoplasies tel que le sarcome de Kaposi (56, 57).

1.7.2. Réponse immunitaire contre le VIH-1

La réaction du système immunitaire face à un agent pathogène peut prendre quelques jours en ce qui concerne la réponse adaptée spécifiquement au pathogène responsable de l'infection (58). La réponse immunitaire innée constitue la première barrière de défense non spécifique contre un microbe donnée.

1.7.2.1. Réponse immunitaire innée

Les principaux acteurs de l'immunité innée sont les cellules dendritiques, les macrophages, les polynucléaires neutrophiles et les cellules NK (58). Les pathogènes possèdent des motifs caractéristiques appelés PAMP (*pathogen-associated molecular patterns*) permettant aux cellules de l'immunité innée de les reconnaître à travers un système de récepteurs nommés PPR (*pattern recognition receptors*) incluant les TLR (*toll like receptors*) (59). À la suite de cette reconnaissance, les cellules expriment des molécules de costimulation et sont en mesure de sécréter plusieurs cytokines. Au cours de l'infection par le VIH-1, les polynucléaires sécrètent des défensines ou HNP (*human neutrophil peptides*) (60) ayant une activité inhibitrice de la réplication virale par action directe sur les virions ou les cellules infectées. Les cellules dendritiques et les macrophages phagocytent les particules virales afin de les présenter aux lymphocytes T par l'intermédiaire du CMH (complexe majeur d'histocompatibilité) de classe I participant ainsi à l'amorce de la réaction immunitaire adaptative. De plus, les cellules dendritiques sécrètent le TNF (*tumor necrosis factor*) améliorant la réponse immunitaire innée contre le VIH-1 (61, 62). Les cellules NK ont, quant à elle, la capacité de reconnaître et de lyser les cellules infectées du fait que ces dernières baissent l'expression du CMH de classe I à leur surface (63, 64). La cytotoxicité des cellules NK est malheureusement amoindrie lorsque la charge virale est très élevée, et est rétablie lorsque la virémie baisse au cours du traitement

antirétroviral (65). Les chimiokines, ligands de CCR5 (CCL3/MIP-1 α , CCL4/MIP-1 β et CCL5/RANTES), sont sécrétées par les cellules NK. Il s'opère donc une compétition entre le virus et les ligands naturels pour la liaison au CCR5 nécessaire à l'entrée du VIH-1 dans la cellule cible, ce qui a pour conséquence de réduire le nombre de cellules infectées (58, 66).

1.7.2.2. Réponse immunitaire adaptative

La réaction immunitaire est constituée d'une réponse à médiation cellulaire (lymphocytes T) et d'une réponse à médiation humorale (lymphocytes B).

1.7.2.2.1. Les lymphocytes T CD4+ spécifiques au VIH-1

Les lymphocytes T CD4+ jouent un rôle crucial dans l'orchestration de la réponse immunitaire à médiation cellulaire (58). Les cellules T CD4+ activées, soient par les protéines de l'enveloppe virale ou même par les protéines Nef Gag et Pol, contrôlent l'activation des lymphocytes B et contribuent fortement à la différenciation des lymphocytes T CD8+ (67-70). Malheureusement, les cellules T CD4+ activées sont très permissives à l'infection par le VIH-1 contribuant à leur déplétion massive au cours de la primo-infection (71, 72). De plus, les lymphocytes T spécifiques au VIH-1 sont plus sujets à l'apoptose du fait, entre autres, de leur faible niveau d'expression de la protéine anti-apoptotique Bcl-2 (73). Par ailleurs, la translocation bactérienne supportant l'activation chronique du système immunitaire oblige un ajustement permanent du stock de cellules T CD4+ qui contribue également à causer leur déficit (50). Par ailleurs, l'expression des molécules de régulation négative de la réponse immunitaire, telles que CTLA-4 (*Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4*) et PD-1 (*Programmed cell death-1*), est régulée à la hausse chez les cellules T CD4+ spécifiques au VIH-1. En effet, après la signalisation du TCR, la modulation de la réaction immunitaire est faite par CTLA-4 et PD-1 (74). De plus, des auteurs ont montré une corrélation positive entre la charge virale, la progression de la maladie et l'expression de ces molécules de régulation négative. À contrario, une baisse du nombre de cellules T CD4+ est observée lorsque l'expression de CTLA-4 et PD-1 est augmentée (75-77).

1.7.2.2.2. Les lymphocytes T CD8+ spécifiques au VIH-1

La progression de l'infection par le VIH-1 dépend fortement de l'efficacité de la réponse cellulaire T CD8+ définissant ainsi la durée de la phase asymptomatique (78).

Les cellules T CD8+ effectrices ou lymphocytes T cytotoxiques apparaissent généralement une à deux semaines suivant le pic de la virémie. En effet, les peptides viraux sont présentés aux cellules T CD8+ dans le contexte du CMH de classe I. Les lymphocytes T CD8+ spécifiques sont alors capables de lyser les cellules infectées (27, 79, 80). Les lymphocytes T CD8+ cytotoxiques détruisent les cellules infectées à travers l'action des enzymes cytolytiques qu'elles libèrent à savoir perforine, granzyme A et granzyme B. Ces enzymes catalysent la voie de mort cellulaire, donc entraînent l'apoptose des cellules cibles (70).

Les cellules T CD8+ spécifiques au VIH-1 possèdent également des propriétés antivirales non cytolytiques. En effet, à l'image des cellules NK, les lymphocytes T CD8+ ont la capacité de sécréter les chimiokines ligands de CCR5 (MIP-1 α , MIP-1 β et RANTES), ce qui limite l'entrée du virion dans la cellule cible et partant contribue à réduire la réplication virale (81, 82). D'autre part, des études ont montré l'activité antivirale non cytolytique d'un facteur soluble nommé CAF (*CD8 T cell antiviral facteur*) uniquement sécrétée par cellules T CD8+. L'effet inhibiteur de la réplication virale de CAF est observé sur le VIH-1, le VIH-2 et le VIS (virus de l'immunodéficience simienne). CAF serait produite uniquement par les cellules T CD8+ des individus à progression lente vers le SIDA et agit en bloquant la transcription virale (83, 84). Des investigations restent encore à faire quant à l'identité moléculaire de CAF.

Ainsi, tous les mécanismes de défense contre l'infection par le VIH orchestrés par les cellules T CD8 finissent par faire chuter considérablement la virémie dès la primo-infection (79). Malheureusement il s'opère, par la même occasion, la sélection de virions mutants avec des séquences génomiques différentes, dans des sites discrets de l'organisme. Par conséquent, les cellules T CD8+ préalablement actives ne sont plus en mesure de reconnaître les virions mutants (85). De nouveaux lymphocytes T CD8+ spécifiques doivent donc être permanemment synthétisés dans un environnement de pression antigénique constante avec déplétion progressive de cellules T CD4+ (50). De plus, la régulation à la hausse de l'expression des molécules immunosuppressives, particulièrement PD-1, dans les lymphocytes T CD8+ spécifiques au VIH-1 témoigne de l'activation chronique du système immunitaire. Il en résulte un épuisement

cellulaire avec défaut de différenciation des cellules T CD8⁺ spécifiques, ce qui corrèle avec une progression plus rapide vers le SIDA (74, 86, 87).

1.7.2.2.3. Les lymphocytes B

Dans le contexte de l'infection à VIH-1, les lymphocytes T CD4⁺ activés induisent la différenciation des lymphocytes B en cellules capables de produire et sécréter diverses variétés d'anticorps neutralisants spécifiques des glycoprotéines d'enveloppe gp41 et gp120 ainsi que d'autres protéines virales telle que la p24. La chute de la charge virale observée dès la primo-infection est concomitante à la production accrue d'anticorps spécifiques (88-90). Cependant, des mutations au niveau des régions non constantes de l'enveloppe sont sélectionnées permettant aux virions d'échapper à la réaction immunitaire. Par conséquent, les anticorps existants ne seront plus actifs sur les nouveaux virions mutants. Toutefois, les régions conservées des glycoprotéines d'enveloppe tel que le site de fixation à la molécule CD4 ne subissent pas de mutations. Malheureusement, les anticorps neutralisants spécifiques des régions constantes de l'enveloppe sont produits généralement 20 à 30 mois après l'infection (209). Ces anticorps sont donc rarement ou tardivement retrouvés chez les sujets à progression rapide vers le SIDA (91-93). De plus, durant la phase chronique, le stress antigénique permanent, la diminution progressive du taux de lymphocytes T CD4⁺ et les mécanismes viraux d'échappement intempestifs au système immunitaire finissent par entraîner un épuisement cellulaire et un dysfonctionnement de la réponse humorale avec perte de mémoire immunologique des lymphocytes B. Plusieurs anticorps non spécifiques des nouveaux épitopes générés sont alors produits. Finalement, les anticorps spécifiques des régions conservées générés à un stade généralement avancé de l'infection ne sont plus en mesure de restaurer la réponse immunitaire assez rapidement (94).

Par ailleurs, l'inhibition de la réplication virale impliquant la cytotoxicité cellulaire dépendant des anticorps (*ADCC* pour *Antibody-dependent cellular cytotoxicity*) a été également rapportée chez les sujets infectés par le VIH-1. En effet, le mécanisme ADCC évoqué ici est médié par les récepteurs pour le fragment Fc de certains anticorps produits en réponse à l'infection par le VIH-1, principalement le récepteur FcRIII (CD16). Plusieurs cellules à savoir les cellules NK, monocytes, macrophages, ou les polynucléaires neutrophiles sont capables de lyser la cellule infectée. En fait, l'anticorps, à travers son domaine Fab reconnaît la cellule infectée et de façon

concomitante est capable de se lier à la cellule effectrice à l'aide de son domaine Fc. Il s'en suit une dégranulation de la cellule effectrice entraînant la lyse de la cellule ciblée (192-199).

1.8. Traitement de l'infection à VIH-1

Lorsque le VIH a été découvert dans les années 1980, il n'existait pas de thérapie et les seules approches consistaient à effectuer un traitement palliatif des infections opportunistes liées au déficit immunitaire. Ce fut en 1987 que la Zidovudine (AZT), premier médicament agissant directement sur le virus en inhibant la transcriptase inverse fut commercialisé (95, 96). Par la suite, plusieurs autres molécules antirétrovirales, agissant à différentes étapes du cycle de réplication du VIH-1, furent mises sur le marché. Au milieu des années '90, l'instauration de schéma de traitement basés sur la combinaison de plusieurs antirétroviraux (HAART pour *Highly Active Antiretroviral Therapy*) incluant deux inhibiteurs de la transcriptase inverse (AZT et 3TC) et un inhibiteur de la protéase (97, 98) a permis de diminuer significativement la morbidité et la mortalité associées au VIH. Depuis, plus de 30 médicaments appartenant à 5 classes d'antirétroviraux incluant les inhibiteurs de corécepteurs et les inhibiteurs d'intégrase ont été développés, formulés seuls ou en combinaison, et offrent un choix thérapeutique intéressant aux personnes vivant avec le VIH contribuant à une augmentation significative de leur espérance de vie. La HAART permet généralement un déclin de la charge virale plasmatique jusqu'à des taux indétectables (<40 copies d'ARN/mL) tout en favorisant une restauration considérable des fonctions du système immunitaire (27, 102). Cependant, le virus persiste également dans des endroits, appelés sanctuaires, presque inaccessibles aux molécules antirétrovirales tels que l'œil et le cerveau. Ainsi, l'arrêt de la thérapie antirétrovirale entraîne systématiquement un rebond de la charge virale. Pourtant, un traitement à vie augmente les risques de toxicité et de résistance aux antirétroviraux (103, 104). De nombreuses études sont donc en cours pour réactiver les réservoirs viraux afin de les rendre accessibles aux antirétroviraux.

D'autres parts, plusieurs approches de thérapies préventives contre l'infection par le VIH-1 sont en investigations. L'essai vaccinal RV144 (*Thai vaccine trial*) fut le premier à révéler une protection contre l'infection par le VIH-1 avec un taux de 31%. Cette protection était exercée par l'induction d'anticorps non neutralisants et de réponses cellulaires T modérées (200). La découverte des anticorps neutralisants à large spectre produits par certains sujets séropositifs est à

la base de nombreux travaux concourant à la découverte d'un vaccin (209). Toutefois, un des obstacles majeurs rencontrés est la difficulté d'induction de ces anticorps par la vaccination. En fait, ces anticorps neutralisants sont issus de multiples hypermutations (93). Par ailleurs, il a été montré l'implication du mécanisme de cytotoxicité cellulaire dépendant des anticorps dans la protection *in vivo* contre l'infection à VIH dans un modèle macaque (201). L'induction des anticorps capable de médier l'ADCC constitue une porte ouverte à de nouvelles investigations dans le cadre de la recherche d'un vaccin contre l'infection à VIH.

1.9. Obstacles de la thérapie anti-VIH-1

Plusieurs obstacles sont rencontrés sur le chemin de l'éradication de l'infection à VIH. Entre autres, l'établissement de réservoirs viraux, l'hyperactivation chronique du système immunitaire entraînant un dysfonctionnement de la réponse immunitaire ont contribué à porter un grand intérêt à la modulation de la réponse immunitaire, comme moyen de contrer l'infection à VIH (208, 210). Par exemple, le blocage des récepteurs des molécules de régulation négative de la réponse immunitaire telles que PD-1 et CTLA-4 constitue une approche de thérapie intéressante (76).

D'autre part, il existe de rares sujets infectés par le VIH-1 qui ont la capacité de maintenir la virémie à des taux faibles parfois indétectables sans thérapie antirétrovirale durant plusieurs années, ils sont appelés progresseurs lents (PL) (105). Ainsi, les PL font l'objet d'intenses recherches dans le cadre de la compréhension des mécanismes immunitaires mis en jeu afin d'inhiber la réplication virale.

1.10. Individus séropositifs à progression lente vers le SIDA

1.10.1. Progresseurs lents et contrôleurs élites

Les sujets à progression lente vers le SIDA également appelés progresseurs lents (PL) représentent une faible proportion des sujets infectés par le VIH ne recevant pas de thérapie antirétrovirale pendant une période pouvant aller à plus d'une vingtaine d'années dans certains cas (105, 209). Contrairement aux progresseurs normaux qui développent le SIDA sans

traitement au bout de 3 à 5 ans après la séroconversion, les PL ont souvent la capacité de demeurer asymptomatiques pendant 10 à 20 ans avec un compte cellulaire T CD4 supérieur à 500/ μ L (106). Bien que les chiffres puissent être sujets à quelques variations selon les études, il est généralement admis que la plupart des PL sont en mesure de contenir la charge virale plasmatique à un niveau inférieur ou égal à 10000 copies d'ARN/mL, plusieurs d'entre eux la maintenant entre 50 et 2000 copies d'ARN/mL (105, 107). Pourtant, parmi les 2 à 5% de personnes séropositives représentant les PL, se trouve un petit groupe d'individus (\leq 1%) capable de maintenir la charge virale plasmatique à un niveau indétectable ($<$ 50 copies d'ARN/mL) pendant au moins 7 ans: il s'agit des contrôleurs élites (EC) ou élites supprimeurs du VIH-1 (108, 109).

La capacité exceptionnelle des progresseurs lents à contrer la réplication du VIH-1 sans traitement suscite à l'heure actuelle un intérêt particulier quant à la recherche de moyens pour éradiquer la pandémie occasionnée par le VIH-1.

1.10.2. Facteurs contribuant à la progression lente

Les études sont toujours en cours pour expliquer les mécanismes de contrôle à long terme de la réplication virale chez les PL. Cependant, à l'heure actuelle, plusieurs facteurs d'ordre virologique, génétique et immunologique sont évoqués.

1.10.2.1. Virus atténué

Plusieurs études ont révélé que des délétions ou mutations dans la séquence des acides aminés des gènes régulateurs et accessoires du VIH-1 (*tat*, *rev*, *vpr*, *vpu*, *vif*) peuvent contribuer au contrôle de la réplication virale et partant à la non progression de la maladie (110-115).

En effet, une mutation en position 138 dans le gène *nef*, retrouvée plus fréquemment chez les sujets PL que chez les sujets à progression rapide vers le SIDA, a été identifiée comme étant une cause de l'inhibition de la réplication virale chez les sujets à progression lente (112, 116, 117). Cependant, d'autres études effectuées sur une cohorte plus grande, ont révélé qu'en réalité cette mutation du gène *nef* est rarement retrouvée chez les PL. De plus, des travaux ont montré que des virus isolés de sujets EC ont présenté une cinétique de réplication virale normale *in vitro* avec

absence de délétion dans les gènes viraux (118). Ces derniers résultats suggèrent donc que les facteurs liés à l'hôte seraient plus impliqués dans le contrôle à long terme de la réplication virale que les facteurs viraux.

1.10.2.2. Facteurs génétiques de l'hôte

Le récepteur de chimiokine CCR5 est utilisé comme corécepteur majeur permettant l'entrée des souches virales à tropisme R5. Un polymorphisme dans le gène codant pour l'expression de CCR5 est associé à une progression plus lente de l'infection à VIH-1 (119-121). Une étude a montré qu'environ 27% des sujets PL portent une délétion de 32 paires de bases dans le gène codant pour CCR5 (*CCR5-Δ32*) contrairement à seulement environ 1% chez la population caucasienne (122). De plus, les individus homozygotes pour le gène mutant *CCR5-Δ32* sont résistants à l'infection par les souches de VIH-1 à tropisme R5 puisqu'il n'exprime pas CCR5 à la surface de leurs cellules (119). Également, dans une moindre mesure, d'autres études ont relevé qu'un polymorphisme dans les récepteurs de chimiokines CCR2 et CX3CR1 parfois utilisés comme corécepteurs d'entrée pour le VIH-1 est associé à une progression lente de la maladie (123-125).

Les molécules HLA de classe I présentent les antigènes intracellulaires aux cellules T CD8+. De façon intéressante, des variants de la molécule HLA B57 soient B5701 et B5703 ainsi que la molécule HLA B27 ont été associés à une progression lente de l'infection à VIH-1 chez certains PL (126, 199).

1.10.2.3. Facteurs immunologiques

1.10.2.3.1. Immunité innée

La première barrière de défense contre toute infection est assurée par l'immunité innée. Ainsi, les interférons (IFN) font partie des premières substances antivirales synthétisées. En effet, les particules du VIH-1 induisent la sécrétion d'interférons de type I (IFN α et IFN β) principalement à travers les voies d'activation des TLR 7 et TLR 8 (127, 207). Les IFN de type I exercent leur action antivirale aussi bien au niveau des phases précoces que tardives du cycle de

réplication du VIH-1 empêchant l'infection de plusieurs cellules, ainsi que la transmission virale des cellules dendritiques vers les cellules T CD4⁺ (128, 129). Les cellules dendritiques plasmacytoïdes, principales productrices d'IFN α *in vivo*, sont retrouvées en plus grande fréquence chez les PL par rapport aux progressseurs normaux (130). Cependant, une production exagérée d'IFN s'avère dangereuse car entraîne l'augmentation de l'expression de CCR5, corécepteur du VIH-1 participant ainsi à l'activation immune anormale (131). Il s'avère que les PL, à l'opposé des sujets à progression rapide, sont capables de moduler la synthèse d'IFN, par un mécanisme qui demeure toutefois inconnu (132). D'autre part, les facteurs de restriction intrinsèques de l'immunité anti-VIH-1 tels que TRIM 5 α , APOBEC3 et Tetherin exprimés de façon constitutive voient leur expression augmenter suite à la production d'IFN en réponse à l'infection par le VIH-1 (133, 134).

D'autre part, plusieurs études ont montré que les cellules NK des PL présente un phénotype différent de celui des progressseurs normaux et des sujets VIH négatif. En effet, ces dernières produisent significativement plus d'IFN-gamma (IFN γ) utilisé comme principal moyen de contrôle de la réplication virale par les NK (135, 136). Par ailleurs, des études récentes ont indiqué qu'au stade précoce de l'infection, une co-expression et une interaction forte entre les récepteurs régulateurs à la surface des cellules NK (KIR3DL1 et KIR3DS1) et l'allèle HLA-Bw4-081 permettent un contrôle de la virémie ainsi qu'un ralentissement de la progression vers le SIDA (137-139).

Même si la plupart des mécanismes de l'immunité innée contre le VIH-1 chez les PL reste à démontrer, il est possible de supposer que la réplique rapide et bien orchestrée contre l'invasion du système immunitaire permet de réduire considérablement le réservoir et la dissémination virale constituant ainsi une base solide à l'immunité adaptative.

1.10.2.3.2. Lymphocytes T CD4⁺

Le mécanisme de contrôle de la virémie à long terme par les cellules T CD4⁺ est peu connu. Cependant, une étude avait rapporté que les lymphocytes T CD4⁺ des PL abritent très peu d'ADN proviral indiquant la pauvreté du réservoir viral (140). Toutefois, il a été montré plus tard que la persistance d'un faible niveau de réplication virale chez les EC finit tout de même par avoir des conséquences négatives sur l'évolution de la maladie. En effet, une étude ayant

quantifiée l'ARN du VIH-1 dans le plasma des sujets EC a montré que les fluctuations de la virémie même en dessous de 50 copies d'ARN/mL révélaient une corrélation positive avec la diminution du compte cellulaire T CD4+ chez les EC ayant le plus grand nombre de copies d'ARN viral (202, 203). Par ailleurs, durant l'infection chez les PL, le compte cellulaire T CD4+ demeure normal ou très faiblement diminué corrélant inversement avec la charge virale (141). Contrairement aux sujets à progression normale vers le SIDA, les cellules T CD4+ des PL expriment des niveaux moins élevés des molécules de régulation négative CTLA-4 et PD-1 signant d'une activation moindre du système immunitaire, ce qui freine considérablement l'épuisement immunitaire (77, 142). Ainsi, les lymphocytes T CD4+ des PL ont conservé leur polyfonctionnalité à savoir la production abondante d'interleukine-2 (IL-2) et d'IFN γ attestant d'une bonne prolifération et réponse cellulaires face à l'infection virale (143). Peu d'études ont montré que les cellules T CD4+ des sujets PL produisent plus de CCL3/MIP-1 α contrairement aux sujets à progression normale (144). Les ligands naturels des corécepteurs CCR5 (CCL3/MIP-1 α , CCL4/MIP-1 β et CCL5/RANTES) et CXCR4 (SDF-1) se comportent comme des inhibiteurs compétitifs pour l'entrée du VIH-1 (58, 66).

Il est également évoqué la résistance à l'apoptose des cellules T CD4+ des PL à travers l'inactivation du facteur de transcription FOXO3a (145).

1.10.2.3.3. Lymphocytes T CD8+

La capacité extraordinaire de répression de la réplication virale à long terme observée chez les PL est majoritairement attribuée à la polyfonctionnalité de leurs lymphocytes T CD8+. En effet, les cellules T CD8+ des PL sont très hétérogènes quant à la sécrétion de cytokines et à leur différenciation (146, 147). Des études ont montré la capacité, sans stimulation préalable *in vitro*, de cellules T CD8+ fraîchement isolées de PBMC (*ex vivo*) de sujets PL à inhiber la réplication virale dans des cellules T CD4+ autologues (148, 149). Le mécanisme d'inhibition évoqué dans cet essai réside en un contact direct contre la protéine *gag* plutôt que les protéines *env* et *nef*, révélant les propriétés antivirales immédiates dont sont dotées les cellules T CD8+ des PL (150). En outre, le mécanisme par lequel les chimiokines sécrétées par les cellules T CD8+ des sujets PL inhibe la réplication virale est inconnu, cependant il est couramment rapporté une sécrétion accrue d'IFN γ , d'IL-2, de CCL4/MIP-1 β et de TNF- α (151, 152). En plus,

contrairement aux progressseurs normaux, les cellules T CD8⁺ des PL produisent une plus grande quantité de granzymes B (78) et expriment très faiblement la molécule PD-1, améliorant ainsi leur activité cytotoxique (75). Par ailleurs, le facteur soluble CAF (*CD8 T cell antiviral factor*), une protéine de faible poids moléculaire (10-50 kDa) sécrétée par les cellules T CD8 des PL exerce son activité antivirale de façon non cytotoxique (84).

De plus, des travaux décrivent la capacité des cellules T CD8⁺ des PL à induire l'expression à la hausse des marqueurs CD16 et CD56 favorisant l'activation des cellules NK (153). Par ailleurs, l'efficacité des fonctions antivirales des cellules T CD8⁺ des PL est amoindrie chez ceux dépourvus de la coexpression des récepteurs régulateurs à la surface des cellules NK (KIR3DL1 et KIR3DS1) et l'allèle HLA-Bw4-081 (149, 154).

La majorité des mécanismes par lesquels les sujets PL répriment la réplication virale reste à démontrer. À l'heure actuelle, on ne connaît pas de facteur unique responsable du contrôle de l'infection chez les progressseurs lents, d'où l'intérêt de poursuivre les recherches. Ainsi, nous avons porté notre attention à une interleukine relativement peu étudiée dans le contexte de l'infection par le VIH-1: il s'agit de l'interleukine-32.

1.11. Interleukine-32

1.11.1. Identification de l'interleukine-32

Les premiers indices de la découverte de l'interleukine-32 (IL-32) furent émis en 1992. Auparavant appelée NK4, cette protéine d'environ 27 kDa est fortement exprimée dans les cellules T et NK activées. Rapidement, il a été également démontré que son expression est régulée à la hausse dans les PBMC après stimulation par le PHA (phytohémagglutinine) (155). Cependant, jusqu'en 2005, la fonction biologique de la protéine NK4 demeurait inconnue. Ce fut Kim et collaborateurs qui, pour la première fois, évoquèrent la capacité de la protéine NK4 à induire la sécrétion de plusieurs cytokines pro-inflammatoires telles que TNF- α et IL-8. Ainsi, l'attribution de propriétés pro-inflammatoires à la protéine NK4 lui a valu le nom d'interleukine-32 même si sa structure n'est pas strictement similaire à celle de la plupart des cytokines connues. Chez l'humain, le gène de l'IL-32 est localisé sur le chromosome 16. L'ARN messager de l'IL-

IL-32 est principalement retrouvé dans les cellules et tissus de l'immunité mais également dans les cellules épithéliales. Le taux de l'IL-32 endogène peut être modulé par plusieurs stimuli d'origine microbienne à savoir les lipopolysaccharides (LPS) bactériens (175).

Par ailleurs, l'IL-32 n'a pas été retrouvée chez les rongeurs tels que le rat et la souris. Plusieurs études ont été effectuées afin d'identifier une protéine similaire à l'IL-32 humain chez la souris. Il s'est avéré qu'une grande partie du gène de l'IL-32 était manquante chez la souris, et on ne sait toujours pas si une transcription fonctionnelle est faite. Toutefois, chez d'autres espèces telles que le porc et le cheval, des homologues de l'IL-32 ont été identifiés (174).

1.11.2. Isoformes de l'IL-32

Les isoformes de l'IL-32 sont actuellement au nombre de neuf à savoir IL-32 α , IL-32 β , IL-32 γ , IL-32 δ , IL-32 ϵ , IL-32 ζ , IL-32 η , IL-32 ς et IL-32 θ (156, 191). Les quatre principales isoformes sont IL-32 α , IL-32 β , IL-32 γ et IL-32 δ (figure 5). Toutefois l'isoforme bêta (IL-32 β) semble être la plus abondante (157).

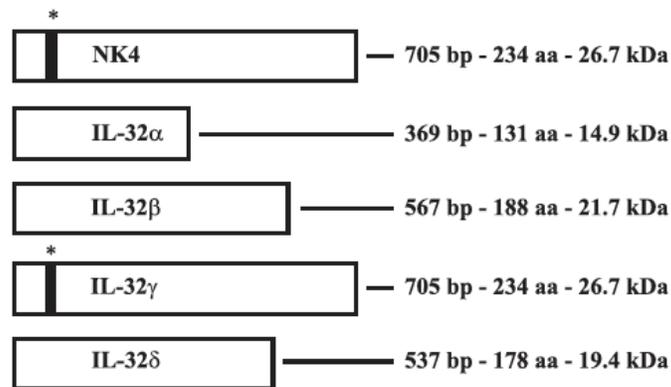


Figure 5. Principales isoformes de l'IL-32 (IL-32 α , IL-32 β , IL-32 γ , IL-32 δ). Adapté de Heinhuis B et al. (159) et reproduit avec la permission de Elsevier: Cytokine, copyright 2012.

L'isoforme gamma (IL-32 γ) se révèle être la plus impliquée dans la mort et l'activation cellulaire. Ce qui pourrait expliquer son épissage afin d'obtenir des formes 'moins actives' telles que l'IL-32 α et l'IL-32 β (figure 6). En effet, en plus de favoriser la sécrétion d'autres cytokines pro-inflammatoires, la surexpression de l'IL-32 γ endogène cause la mort cellulaire, ce qui n'est pas le cas pour l'IL-32 α (158-160).

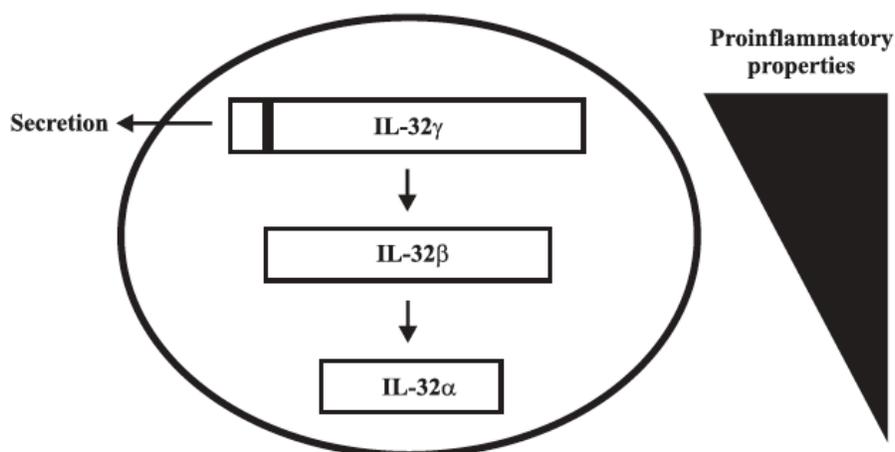


Figure 6. Épissage de IL-32 γ générant des isoformes (IL-32 α , IL-32 β) à propriétés pro-inflammatoires amoindries. Adapté de Heinhuis B et al. (159) et reproduit avec la permission de Elsevier: Cytokine, copyright 2012.

1.11.3. Mécanismes d'induction et fonctions de l'IL-32

La découverte des propriétés biologiques de l'IL-32 a fait grandir l'intérêt d'étudier davantage cette cytokine. Les recherches visant à identifier la cascade de signalisation exacte de l'IL-32 constituent le centre d'intérêt de nombreuses études. À l'heure actuelle, il n'est pas connu de récepteur spécifique à l'IL-32 même si des études ont rapporté que cette cytokine est capable de se fixer aux intégrines ($\alpha V\beta 3$ et $\alpha V\beta 6$) à la surface cellulaire, identifiant ainsi ces intégrines comme plausibles récepteurs de l'IL-32 exogène (160). Pourtant plusieurs travaux portant sur l'induction de l'expression de l'IL-32 dans divers types cellulaires (PBMC, monocytes, cellules NK, cellules T, fibroblastes, kératinocytes, cellules endothéliales) en utilisant des stimuli différents, convergent vers le fait que l'IL-32 est une cytokine d'expression principalement intracellulaire quoiqu'une fixation membranaire soit mentionnée (173). Il serait ainsi possible de supposer que dans la plupart des cas, l'augmentation de l'IL-32 exogène est liée à une cytolysse (174). Hasegawa et collaborateurs ont montré que l'IL-32 est localisée dans les gouttelettes lipidiques de la membrane cellulaire après exposition à l'IFN γ et le TNF- α (173). L'expression de l'IL-32 peut être induite par les produits bactériens (156, 163, 175, 176). De même, les virus sont de bons inducteurs de l'expression de l'IL-32 endogène (177-180). Les mécanismes par

lesquels l'IL-32 endogène ou liée à la membrane cellulaire est exprimée demeure toutefois méconnus (174). Néanmoins, plusieurs voies de signalisation aboutissant à l'expression de l'IL-32 ont été proposées. Par exemple, *Mycobacterium tuberculosis* induit l'expression du gène de l'IL-32 dans les PBMC à travers la voie de signalisation caspase-1/IL-18/interféron-gamma (175). De plus, l'expression de l'IL-32, à la suite d'un stimulus d'origine virale, active la sécrétion de cytokines telles que IL-1 β et TNF- α par la voie NF- κ B (184).

D'autre part, il a été rapporté plusieurs effets de l'IL-32 sur différents types cellulaires. Entre autres, l'expression de l'IL-32 dans les cellules NK augmente leur cytotoxicité envers les cellules cancéreuses via le récepteur de mort 3 (DR-3) médiée par la voie de signalisation de la caspase-3 (181). De plus, les cellules dendritiques dans lesquelles l'IL-32 β a été surexprimée ont révélé un effet thérapeutique lorsqu'injectées directement dans les tumeurs (182). La surexpression de l'IL-32 γ dans les cellules dendritiques favorise la différenciation des lymphocytes T auxiliaires également appelés lymphocytes T CD4+ (Th pour *T helpers*) en Th1 et Th17 (183). En général, la plupart des cellules voient leur activité pro-inflammatoire exacerbée lorsqu'elles sont exposées à une surexpression de l'IL-32 (174).

1.11.4. Rôles et implications de l'IL-32 dans différentes pathologies

Le rôle de l'IL-32 a été évoqué dans les infections à mycobactéries. Le niveau d'expression de l'IL-32 est significativement plus élevé chez les patients infectés par *Mycobacterium avium* comparativement aux patients non infectés. Aussi, l'IL-32 γ recombinant réduit considérablement la multiplication intracellulaire de *Mycobacterium avium* dans les monocytes dérivés de macrophages humains. Le mécanisme anti-mycobactérien évoqué ici serait en partie dû à une augmentation de l'apoptose des cellules infectées (161). Des effets similaires ont été rapportés pour *Mycobacterium tuberculosis* dans une lignée macrophagique humaine (THP-1). L'apoptose observée chez les cellules THP-1 exposées à l'IL-32 recombinant est due à une augmentation de l'enzyme caspase-3 (162).

L'IL-32 est associée à plusieurs pathologies inflammatoires telles que l'arthrite rhumatoïde, la maladie du greffon contre l'hôte et l'athérosclérose. Une augmentation du taux de l'IL-32, aussi bien au niveau de l'ARN messager que de l'expression de la protéine, est rapportée chez ces patients (163-166). Par exemple, dans le cas de l'arthrite rhumatoïde, une élévation du taux d'IL-

32 dans le liquide synovial corrèle avec le niveau d'inflammation ainsi que l'expression de cytokines telles TNF- α et IL-1 β (163).

D'autre part, des travaux ont évoqué le rôle de l'IL-32 dans la physiopathologie de certains cancers. En effet, l'expression de l'IL-32 est nettement diminuée au cours des leucémies myélomonocytaires chroniques. À contrario, cette cytokine est fortement exprimée dans les syndromes myélodysplasiques où elle est associée à une augmentation de l'apoptose des cellules souches de la moelle osseuse (168). Cette modulation de l'expression de l'IL-32 dépendamment des cancers confirme les rôles différents exercés en fonction des isoformes. En fait, une étude a montré que de hauts niveaux d'expression d'IL-32 β ou IL-32 γ sont associés à la mort des cellules HEK, ce qui n'est pas observé pour l'isoforme alpha (IL-32 α) (160). En dehors des leucémies myélomonocytaires chroniques et des syndromes myélodysplasiques, l'expression de l'IL-32 a été évoquée dans plusieurs autres cancers (169-172), confirmant pour certaines études que la mort cellulaire associée à la surexpression de l'IL-32 γ endogène est médiée par la caspase-3 (figure 7).

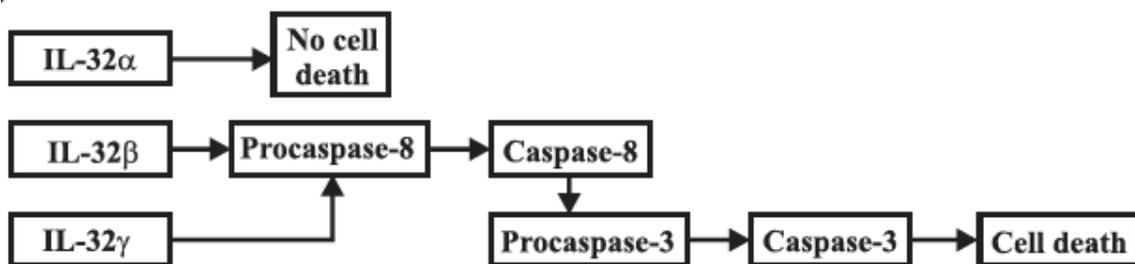


Figure 7. Rôle de l'IL-32 intracellulaire dans la mort cellulaire. Adapté de Heinhuis B et al. (159) et reproduit avec la permission de Elsevier: Cytokine, copyright 2012.

De façon intéressante, certains travaux ont révélé l'implication de l'IL-32 dans l'infection à VIH-1.

1.11.5. IL-32 et infection à VIH-1

Des études ont montré que le taux plasmatique d'IL-32 demeure significativement plus élevé chez les patients séropositifs que chez les sujets VIH négatif (180). De façon intéressante, il a été montré que l'IL-32 possède des propriétés antivirales contre le VIH-1. En effet, une inhibition par *SiRNA* (*small interfering RNA*) de l'expression de l'IL-32 endogène dans des PBMC fraîchement prélevés et infectés *in vitro* entraîne une augmentation de la réplication virale. À l'opposé, une surexpression de l'IL-32 γ recombinant inhibe la prolifération du virus. De plus, le blocage de l'activité biologique des IFN α et β dans des PBMC préalablement traités avec de l'IL-32 γ recombinant favorise une augmentation de la réplication virale. Par conséquent, l'activité antivirale de l'IL-32 passerait par l'action des IFN de type I (185). L'IL-32 exercerait donc son action antivirale dès l'immunité innée impliquant le récepteur NOD (*nucleotide-binding oligomerization domain*)-2 pour la reconnaissance des peptides viraux. Il s'en suivrait alors une activation des facteurs de la régulation des interférons (*IRF* pour *Interferon Regulatory Factors*) responsable de la libération rapide des IFN- α/β qui induisent la production des *interferon-stimulated genes* (*ISGs*) impliqués dans l'inhibition de la réplication virale ainsi que dans l'amplification de la production des IFN de type I (186) (figure 8).

Par ailleurs, une étude plus récente a montré chez des sujets chroniquement infectés par le VIH-1, une corrélation négative entre le taux plasmatique d'ARN viral et les gènes d'expression de l'IL-32 tandis qu'aucune corrélation n'a pu être obtenue entre l'ARN messager de l'IL-32 et le compte cellulaire CD4 (187). De façon intéressante, les PBMC provenant de sujets VIH négatif préalablement traités avec l'IL-32 γ exprime des niveaux transcriptionnels élevés des facteurs de restriction de la réplication du VIH-1 au niveau de l'immunité innée, tels que les protéines APOBEC3G/3F et MxA contrairement aux PBMC non traités (187). Toujours dans la même veine, une corrélation positive a été observée entre les gènes codant pour l'expression des protéines MxA et APOBEC3F et les niveaux d'ARNm de l'IL-32non α dans des PBMC provenant de sujets VIH-1 positif. Cette même corrélation a été observée également avec l'isoforme α (IL-32 α) de façon moins prononcée (187) (*p-value* plus élevé).

Toutefois, il est important de souligner que les études de corrélations et autres résultats rapportés

dans ces travaux ont concerné principalement les niveaux d'ARNm et non les taux plasmatiques d'IL-32.

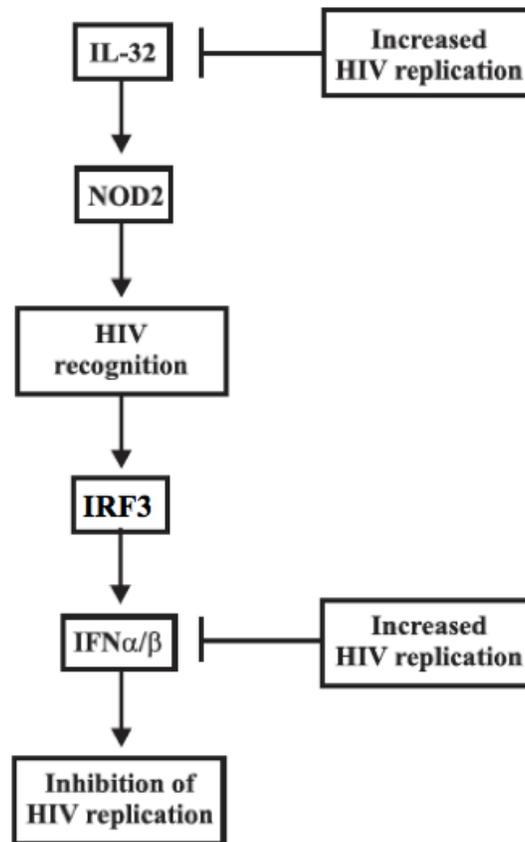


Figure 8. Modèle d'inhibition de la réplication du VIH par l'IL-32 intracellulaire. Adapté de Heinhuis B et al. (159) et reproduit avec la permission de Elsevier: Cytokine, copyright 2012.

D'un autre côté, Smith et collaborateurs attestent que l'IL-32 est doté d'un fort potentiel inducteur de molécules immunosuppressives telles que IDO (*Indoleamine 2,3-Dioxygenase*) et ILT4 (*Ig-like transcript 4*) en accord avec des travaux préalables montrant la capacité de l'IL-32 à induire la production de la cytokine immunosuppressive IL-10 (188, 189). En effet, les leucocytes humains traités avec IL-32 γ recombinant induisent fortement la sécrétion des protéines IDO et ILT4 avec absence de détection de l'expression des marqueurs de prolifération cellulaire. Des résultats similaires ont été obtenus *in vivo* chez des patients VIH-1 positif (188, 190). En fait, le niveau d'expression d'IL-32 dans les muqueuses, principalement dans les macrophages des tissus lymphatiques et les cellules épithéliales de l'intestin, est associé à l'expression de la molécule immunosuppressive IDO à tous les stades (aigu, chronique, SIDA)

de l'infection à VIH-1. De plus, il est montré une corrélation inverse entre le compte cellulaire CD4 ainsi que les fonctions cytolytiques (sécrétion de perforine et de granzyme B) et le niveau d'expression d'IL-32 aussi bien dans le sang périphérique que dans les ganglions lymphatiques provenant de sujets infectés par le VIH-1 (188). Ainsi, ces données suggèrent que l'IL-32 en induisant l'expression des molécules immunosuppressives IDO et ILT4 réprime la prolifération et l'activation cellulaire, et partant nuit à la synthèse de médiateurs cytotoxiques nécessaire à la défense anti-VIH-1 créant ainsi un environnement propice à la réplication virale contribuant à la déplétion du taux de cellules T CD4+ (188).

2. HYPOTHÈSE ET OBJECTIFS

Les sujets à progression lente vers le SIDA constituent à l'heure actuelle, la preuve de la capacité du système immunitaire à contrer la réplication du VIH-1 sans recours à la thérapie antirétrovirale. Cependant, jusqu'à présent, on ne connaît pas de facteur unique permettant aux progressseurs lents de demeurer asymptomatiques durant plusieurs années. Il semble, plutôt, à l'issue de tous les travaux réalisés qu'il s'agit d'un ensemble de facteurs qui convergent vers l'inhibition de la réplication virale.

L'hypothèse ayant supporté l'étude de ce projet est basée d'une part sur des observations faites précédemment au sein de notre laboratoire. En fait, parmi les progressseurs lents du VIH-1, une certaine proportion peut perdre le contrôle de leur infection après de nombreuses années de contrôle virologique. Nous avons effectué des analyses par puces à ADN de plusieurs facteurs à partir de PBMC provenant de ce sous-groupe de progressseurs lents, à deux visites 1 et 2 correspondant à la perte de contrôle. Les résultats ont révélé, entre autres, une diminution significative des isoformes alpha et delta de l'interleukine-32 (et non pas de l'IL-32 total) lorsqu'on passe de la première à la deuxième visite. En fait, il a été prouvé que l'isoforme alpha a des propriétés proinflammatoires très amoindries (158-160), pendant que l'isoforme delta régule à la baisse les propriétés proinflammatoires de l'isoforme bêta (191, 212). Par conséquent, il serait possible ici de suggérer que la baisse du taux de ces isoformes lors de la perte de contrôle de l'infection à VIH-1 chez les progressseurs lents ne reflète pas nécessairement un rôle protecteur de l'IL-32 total. De plus, l'isoforme gamma, la plus active et dotée de propriétés proinflammatoires (158-160) ainsi que les autres isoformes n'ont pas été détectés dans les analyses par puces à ADN. En outre, il est démontré dans la littérature que l'IL-32 total est significativement plus élevée chez les sujets VIH positif par rapport aux sujets VIH négatif (185, 188). De plus, l'isoforme gamma (IL-32 γ) est la plus impliquée dans la mort et l'activation cellulaire et favorise la sécrétion d'autres cytokines proinflammatoires contrairement aux isoformes alpha et delta (158-160). Dans cette même logique, Smith et al. atteste que l'IL-32 γ est doté d'un potentiel inducteur de molécules immunosuppressives pouvant entraîner un environnement propice à la réplication du VIH-1 (188).

Au regard de ces observations, nous avons libellé notre hypothèse comme suit:

Hypothèse: L'interleukine-32 total intervient dans la progression de l'infection à VIH-1 en induisant l'inflammation et l'immunosuppression.

Objectif #1: Comparer les niveaux plasmatiques et cellulaires de l'IL-32 total chez les progresseurs lents par rapport aux progresseurs normaux et aux sujets VIH négatif.

Objectif #2: Évaluer le rôle de l'IL-32 total dans la progression de l'infection à VIH-1.

Objectif #3: Examiner le niveau de certaines isoformes de l'IL-32 chez les sujets VIH positif et VIH négatif.

3. MATÉRIELS ET MÉTHODES

3.1. Population d'étude et spécimens biologiques

Cette étude a nécessité des sujets VIH positif et des sujets VIH négatif. Les sujets VIH positif étaient composés de progresseurs lents et de progresseurs normaux. Les prélèvements ont été effectués avec le consentement éclairé des sujets.

Les échantillons provenant des progresseurs lents proviennent de la «Cohorte canadienne des progresseurs lents VIH+», supportée par les IRSC (Instituts de Recherche en Santé du Canada) et le Réseau FRQS-SIDA/MI (Fonds de Recherche du Québec-Santé).

Les sujets recrutés en primo-infection proviennent de la cohorte de primo-infection de Montréal.

Les plasmas ont été obtenus après centrifugation du sang total. Les PBMC (*Peripheral Blood Mononuclear Cells*) ont été isolés et congelés dans l'azote liquide.

La comparaison des taux d'IL-32 a été effectuée au sein des différents groupes de donneurs virémiques, contrôleurs élités et VIH négatif dont les caractéristiques sont résumées dans le tableau I.

Tableau I: Caractéristiques cliniques des donneurs VIH positif (contrôleurs élités et donneurs virémiques) et VIH négatif.

| DONNEURS | Compte CD4 (cellules/ μ L) | Charge virale (copies/mL) | Durée de l'infection | Thérapie antirétrovirale |
|--------------------|-----------------------------------|------------------------------|-------------------------|-----------------------------|
| Contrôleurs élités | >500 | <50 | >7 ans | non |
| Virémiques | 250-500 | 10283-385782 | \leq 3 mois | non |
| VIH négatif | - | - | - | non |

Par ailleurs, nous avons effectué un suivi du taux plasmatique d'IL-32 chez des sujets en primo-infection et un an après la thérapie antirétrovirale que nous avons comparé avec celui des sujets VIH négatif utilisés comme contrôle. Le tableau II regroupe les caractéristiques des donneurs utilisés.

Tableau II: Caractéristiques cliniques des donneurs VIH positif (en primo-infection et un an après la thérapie antirétrovirale) et VIH négatif.

| DONNEURS | Compte CD4 (cellules/ μ L) | Charge virale (copies/mL) | Durée de l'infection | Thérapie antirétrovirale |
|---|--------------------------------|---------------------------|----------------------|--------------------------|
| VIH positif (primo-infection) | 240-1130 | 70-29981000 | ≤ 3 mois | non |
| VIH positif (un an après la thérapie antirétrovirale) | 350-970 | 40-11130 | >1 an | oui |
| VIH négatif | - | - | - | non |

Afin d'apprécier l'implication de l'IL-32 dans la progression de l'infection à VIH-1, nous avons sélectionné des progresseurs lents en perte de contrôle, dont les plasmas et cellules nous ont permis de réaliser, entre autres, des comparaisons, des suivis du taux d'IL-32 ainsi que des tests de corrélation entre l'IL-32 et plusieurs facteurs permettant d'apprécier la progression de l'infection à VIH-1.

Ces progresseurs lents avaient pour point commun un compte cellulaire CD4 supérieur à 500 cellules/ μ L à l'inclusion et ont été classés selon leur charge virale. En fait, ils étaient constitués de contrôleurs élites (EC), de contrôleurs virologiques (VC pour *Virological controller*) et de contrôleurs non virologiques (NVC pour *Non Virological controller*). Les contrôleurs élites étaient caractérisés par une charge virale inférieure à 50 copies d'ARN/mL tandis que les contrôleurs virologiques avaient une charge virale comprise en général entre 50 et 3000 copies d'ARN/mL et les contrôleurs non virologiques, une charge virale supérieure à 3000 copies d'ARN/mL (204, 205). Le tableau III résume les caractéristiques cliniques de ces progresseurs lents.

Tableau III: Caractéristiques cliniques à l'inclusion des progresseurs lents subdivisés en sous-groupes.

| PROGRESSEURS LENTS* | Compte CD4 (cellules/ μ L) | Charge virale (copies/mL) | Durée de l'infection | Thérapie antirétrovirale |
|------------------------------------|--------------------------------|---------------------------|----------------------|--------------------------|
| Élites contrôleurs (EC) | >500 | <50 | Toute durée | non |
| Contrôleurs virologiques (VC) | >500 | 51-3000 | Toute durée | non |
| Contrôleurs non virologiques (NVC) | >500 | >3000 | >7 ans | non |

*Nous avons également inclus un sous-groupe de sujets à progression lente nommé «exceptions» qui ne répondent pas aux critères de sélection regroupés dans le tableau III, mais qui toutefois contrôlent l'infection à VIH-1 depuis 7 ans au moins.

Par ailleurs, il peut arriver que quelques rares sujets échappent à cette classification à cause de phénomènes temporaires tels que des variations brusques de la virémie et/ou du compte cellulaire CD4.

Pour les études de corrélation et le suivi du taux d'IL-32 durant la progression de l'infection à VIH-1, nous avons utilisé des échantillons provenant de progresseurs lents en perte de contrôle, à deux visites espacées de 6 à 96 mois: Visite 1 (V1) et Visite 2 (V2) correspond à la perte de contrôle. Toutefois les donneurs, à la visite 2, ne présentaient pas de symptômes du SIDA.

Nous avons également utilisé des progresseurs normaux (PN) constituant le groupe de sujets contrôle.

3.2. Analyse par puces à ADN

Cette technique avait été préalablement effectuée au sein de notre laboratoire.

L'ARN total des PBMC provenant de 5 progresseurs lents a été extrait en utilisant le kit *RNeasy columns* (Qiagen Cat # 74104). Ces progresseurs lents ont été sélectionnés à deux visites (avant et après la perte de contrôle). De façon succincte, les cellules ont été lysées à l'aide du tampon de lyse fourni par le kit. Par la suite, l'ARN a été isolé par passages sur les colonnes à l'issue de centrifugations et lavages en utilisant les tampons fournis dans le kit. Les ARN ont été acheminés à Génome Québec (Montréal, Québec, Canada) pour traitement, hybridation et lecture de la biopuce. Décrite de façon brève, l'intégrité des ARN a été validée par la technologie Bioanalyzer (Agilent Technologies Inc., Mississauga, Ontario, Canada). D'abord, les ARN ont été rétrotranscrits en ADN complémentaires (ADNc) par une transcriptase inverse. Ensuite, une transcription *in vitro* a été faite permettant d'obtenir des ARNc biotinylés qui ont été fragmentés puis hybridés sur une biopuce *Illumina HumanHT-12 v4 Expression BeadChip* recouverte de séquences distinctes d'oligonucléotides couvrant 47 000 transcrits et variants, ce qui représente environ 39 000 gènes humains. Les données obtenues ont subi une série d'analyses afin de repérer des biais ou variations. Pour les différents gènes exprimés, l'analyse a été effectuée par le

progiciel Bioconductor *limma* (*Linear Models for Microarray Data*) qui estime le facteur de changement (FC, fold-change) entre des groupes prédéfinis (213). L'expression différentielle des gènes entre les groupes a été considérée significative lorsque le facteur de changement est supérieur à 1,3 et le *p-value* inférieur à 0,05.

Les gènes d'intérêt issus de nos données expérimentales ont été mise en évidence par une analyse d'enrichissement d'ensemble de gènes (GSEA, Gene Set Enrichment Analysis) effectuée comme décrit (214) sur les collections de base de données MsigDB (Molecular Signature Database, Broad Institute, MIT, Harvard, Cambridge, MA, Etats-Unis).

3.3. Mise en culture des PBMC

Les PBMC après décongélation ont été mis en culture dans une solution contenant du RPMI 1640 avec 1% de pénicilline/streptomycine et 10% de FBS (*Fetal Bovine Serum*) à raison de 0,5million/200uL dans des plaques à fond plat de 96 puits. Les cellules ont été stimulées ou non avec du PHA/IL-2 aux concentrations de 3ug/mL de PHA et 20U/mL d'IL-2 (adapté de Nold et al. (185)). Les PBMC en culture ont été incubées à 37°C pendant 24 heures. Les surnageants et culots cellulaires ont été ensuite recueillis pour le dosage de l'IL-32.

3.4. Infection *in vitro* par le VIH-1

Les PBMC stimulées ou non ont été infectées par spinoculation (215) avec la souche de laboratoire VIH-BaL (disponible au laboratoire) à raison de 50 ng par million de cellules. Après l'infection, les PBMC ont été lavés deux fois dans du tampon PBS par centrifugation à 1500 rpm pendant 5min. Finalement, les cellules ont été mises en suspension dans un milieu RPMI-1640 avec 10% de FBS avant d'être mises en culture pendant 72 heures à 37°C à raison de 0,5 million/200uL dans des plaques à fond plat de 96 puits. Les surnageants ont par la suite été recueillis pour le dosage de l'IL-32.

3.5. Technique de Bradford

Cette technique a été réalisée à l'aide de la trousse *Quick Start Bradford Protein Assay* (BioRad® Hercules, CA, Etats-Unis). Décrite de façon brève, des dilutions binaires de la protéine BSA (*Bovine Serum Albumin*) ont été réalisées afin de constituer la courbe standard composée de huit points dont le plus haut point de gamme avait une concentration de 2 mg/mL. Les culots de PBMC ont été lysés. Le tampon de lyse était composé d'une solution de RIPA 1X (*Cell Signaling*®, Cat # 9806) ayant la capacité de lyser la membrane cellulaire, d'inhibiteurs enzymatiques à savoir un inhibiteur de la protéase 7X (*Roche*® Cat #04 693 159 001), et un inhibiteur de la phosphatase 10X (PhoSTOP 10X *Roche*® Cat #04 906 837 001) afin d'éviter la destruction des protéines destinées à être quantifiées. Le tampon de lyse a été utilisé pour faire le blanc. Les dilutions de la BSA ainsi que les lysats protéiques et le colorant bleu de coomassie (*Biorad*® Cat #1610406) ont été ajoutés à une plaque de 96 puits. Le bleu de coomassie est une solution acide, laquelle, de part ses propriétés physico-chimiques a la capacité de se fixer aux protéines présentes dans le lysat. L'absorbance du mélange est alors mesurée à 595 nm à l'aide d'un spectrophotomètre. La concentration protéique des échantillons a été déduite des densités optiques mesurées et de la courbe standard.

3.6. Technique ELISA

Les taux d'IL-32 dans les plasmas, surnageants et lysats cellulaires ont été mesurés par ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) à l'aide du kit *DuoSet ELISA human IL-32* (USA & Canada, R&D System Inc.) utilisant la technique ELISA en sandwich. Nous le qualifions d'IL-32 total car permet de mesurer les principales isoformes.

Brièvement, l'anticorps spécifique des isoformes α , β et γ de l'IL-32 est préalablement ajouté au fond de la plaque (96 puits *Immulon*) et le tout est incubé toute la nuit. Le lendemain matin, la plaque est lavée avec une solution composée de PBS (pH compris entre 7,2 et 7,4) et de 0,05% de Tween20. La plaque est saturée pendant une heure à l'aide d'une solution constituée de PBS (pH compris entre 7,2 et 7,4) et de 1% de BSA afin de bloquer les éventuels endroits non tapissés par l'anticorps. La gamme standard est réalisée à partir d'une solution de concentration en IL-32 connue à l'aide de laquelle plusieurs dilutions binaires allant de 5000 pg/mL à 78,1 pg/mL sont

effectuées en utilisant la solution de PBS 1%BSA qui a également servie pour faire le blanc. Les échantillons, dilués au demi (1/2) dans la solution de PBS 1%BSA ainsi que la gamme standard sont ajoutés à la plaque et incubés pendant deux heures. Après lavage, l'anticorps de détection (Ac biotinylé anti-IL-32) est ajouté, suivi d'une incubation de deux heures. La streptavidine liée à l'enzyme HRP (*horseradish-peroxydase*) est ajoutée après lavage et la plaque est incubée à l'abri de la lumière pendant 20 minutes. Le substrat spécifique de l'enzyme est additionné suivi d'une incubation de 20 minutes à l'abri de la lumière. Finalement, la réaction est arrêtée à l'aide d'une solution d'acide sulfurique à 2N. La plaque est lue au spectrophotomètre à 450 nm. La concentration en IL-32 des échantillons est déduite à partir de la densité optique et de la courbe standard. Toutes les incubations ont été faites à température ambiante (20-25°C).

Pour ce qui concerne les lysats de PBMC, les concentrations d'IL-32 obtenues après ELISA ont été normalisées par rapport à la quantité totale de protéine dans le lysat. La normalisation du taux d'IL-32 total a été faite en divisant la concentration d'IL-32 total obtenu par rapport à la quantité de protéine totale (mesurée par la technique de Bradford) contenu le même volume de lysat utilisé pour le dosage de l'IL-32.

La technique ELISA par compétition a été utilisée pour la détection de l'isoforme alpha (IL-32 α) à l'aide du kit *Human Interleukin 32 alpha (IL-32 α)* de la compagnie *MyBioSource*.

Brièvement, les échantillons dilués au demi (1/2) dans du PBS (pH compris entre 7,0 et 7,2) ainsi que la gamme standard constituée de différentes dilutions de solutions d'IL-32 α de concentrations allant de 0 pg/mL à 1000 pg/mL sont ajoutés à la plaque pré-tapissée par un anticorps spécifique anti-IL-32 α . Le blanc est représenté par le PBS (pH 7,0 – 7,2). Le conjugué est ajouté et après mixage, la plaque est recouverte et incubée pendant une heure à 37°C. Ensuite, la plaque est lavée. Après avoir ajouté le substrat, la plaque est recouverte et incubée à l'abri de la lumière pendant 10 à 15 minutes à température ambiante. La réaction a été arrêtée et les densités optiques mesurées au spectrophotomètre à 450 nm.

La solution de lavage, le conjugué, le substrat et la solution d'arrêt sont fournis dans le kit.

La concentration en IL-32 α des échantillons est déduite à partir des densités optiques mesurées et de la courbe standard.

Le taux de CD14 soluble avait été préalablement déterminé au sein du laboratoire par la technique ELISA en sandwich. Le kit utilisé était *Quantikine ELISA Human sCD14 Immunoassay* de la compagnie *USA & Canada, R&D System Inc.*

De façon brève, les plasmas ont été dilués au 1/200 et 1/400 dans le *calibrator diluent*. La préparation de la gamme standard a été faite à partir d'une solution de concentration connue en sCD14. Ainsi, plusieurs dilutions binaires dans le *calibrator diluent* ont permis de constituer la gamme standard allant de 8000 pg/mL à 250 pg/mL. Le *calibrator diluent* a servi de blanc.

Les échantillons dilués et la gamme standard ont été ajoutés à la plaque pré-tapissée par un anticorps spécifique à la molécule sCD14 destinée à être quantifiée et contenant le diluent (*Assay diluent*) préalablement distribué. La plaque est recouverte et incubée pendant 3 heures à température ambiante. Après lavage, le conjugué est ajouté et la plaque est recouverte pour une incubation d'une heure à température ambiante. La plaque est lavée et le substrat est distribué pour une incubation de 30 minutes à température ambiante à l'abri de la lumière. La réaction a été arrêtée et les densités optiques mesurées au spectrophotomètre à 450 nm.

La solution de lavage, le conjugué, le substrat, le *calibrator diluent*, le diluent (*Assay diluent*) et la solution d'arrêt sont fournis dans le kit. La concentration en IL-32 α des échantillons est déduite à partir des densités optiques mesurées et de la courbe standard.

3.7. Isolation des cellules T CD4+ et stimulation

Après décongélation des PBMC, les cellules T CD4+ ont été isolées par sélection négative à l'aide du kit *EasySep Human CD4T Enrichment (StemCell® Cat #19052)* selon le protocole fourni. L'analyse par cytométrie en flux au FACS (LSRII BD®) après un marquage de surface des cellules T CD4+ par les anticorps de la compagnie BD® à savoir CD3-Pacific Blue (UCHT1) et CD4-Alexa Fluor 700 (RPA-T4) a montré une pureté supérieure à 98%.

Les cellules T CD4+ purifiées ont été stimulées dans une plaque tapissée par des anticorps anti-CD3 (0,5 μ g/mL) (*BD biosciences®*, Cat #555329) et des anticorps solubles anti-CD28 (0,5 μ g/mL) (*BD biosciences®*, Cat #5555726) en présence ou non de 500ng IL-32 α (*BioLegend®* Cat # 551004) ou IL-32 γ (*R&D Systems®* Cat # 4690-IL-025/CF). Les cellules ont été mises en culture à 37°C pendant 3 jours. Les cytokines sécrétées dans le surnageant ont été mesurées par la technique *Multiplex Bead Array*.

3.8. Technique *Multiplex Bead Array*

Les cytokines sécrétées ont été mesurées dans le surnageant des cellules T CD4⁺ activées à l'aide du kit *LEGENDplex™ Human Th Cytokine Panel* (BioLegend Cat # 740001). Il s'agit d'un test immunoenzymatique basé sur le principe de base des tests immunoenzymatiques en sandwich. Décrite de façon brève, les standards, surnageants de culture, billes de capture et les anticorps de détection biotinylés sont ajoutés successivement dans la plaque 96 puits à fond en V contenant préalablement le tampon (fourni dans le kit) composé des anticorps spécifiques des cytokines d'intérêt. Par la suite, la plaque est recouverte de papier aluminium afin de la protéger de la lumière et incubée sous agitation (environ 600 rpm) pendant 2 heures à température ambiante. Après l'incubation, la streptavidine-phycoérythrine (SA-PE) (marqueur fluorescent) est ajoutée sans lavage. La plaque est protégée de la lumière et incubée sous agitation pendant 30 minutes à température ambiante. La SA-PE va ainsi se fixer à l'anticorps biotinylé dans le cas où il y a eu formation d'immunocomplexes et la fluorescence sera proportionnelle à la quantité de cytokines dans le milieu. Ensuite, le maximum de surnageants est délicatement prélevé après centrifugation et la plaque est lavée à l'aide du tampon de lavage fourni dans le kit. Les billes sont par la suite remises en suspension dans la solution de lavage. La fluorescence émise proportionnelle à la quantité de cytokines dans le milieu est mesurée par cytométrie en flux.

3.9. Statistiques

Les analyses statistiques ont été effectuées à l'aide du logiciel *Prism 6*. Les écarts entre les groupes ont été considérées significatives lorsque la valeur du $p < 0,05$. Ces différences ont été évaluées à l'aide du test paramétrique *Student* pour les échantillons appariés et non appariés. Le test non paramétrique *Kruskal-wallis* a été utilisé pour la comparaison entre plusieurs groupes d'échantillons non appariés. Les tests non paramétriques *Mann Whitney* et *Wilcoxon* ont été respectivement utilisés pour les échantillons non appariés et appariés. Le test non paramétrique *Spearman* a été utilisé pour les études de corrélation.

4. RÉSULTATS

4.1. Analyse par puces à ADN

Préalablement au sein du laboratoire, nous avons analysé l'expression différentielle de différentes protéines et voies moléculaires associées à la perte de contrôle de l'infection. À cette fin, nous avons sélectionné 5 progresseurs lents qui avaient perdu le contrôle de leur infection après plusieurs années de contrôle: la visite 1 (V1) correspondant au contrôle de l'infection à VIH-1 et la visite 2 (V2) correspondant au moment de la perte de contrôle. L'expression de plusieurs protéines ont varié de la visite 1 à la visite 2 (annexe 1). Nous nous sommes penchés particulièrement sur la diminution des isoformes alpha et delta de l'IL-32 (et non de l'IL-32 total) (figure 9) étant donné le caractère innovateur de cette observation. En effet, le rôle de l'IL-32 dans la progression de l'infection à VIH-1 chez les progresseurs lents n'avait pas encore été étudié. En fait, l'isoforme alpha a des propriétés proinflammatoires très amoindries contrairement à l'isoforme gamma (158-160). En plus, l'isoforme delta régule à la baisse les propriétés proinflammatoires de l'isoforme bêta (191, 212). Par ailleurs, l'isoforme gamma, n'a pas été détecté dans les analyses par puces à ADN. Par conséquent, ces observations ne confirment pas le rôle protecteur de l'IL-32 total dans la progression de l'infection à VIH-1. De plus, il a montré d'une part que l'IL-32 total est augmenté chez les sujets séropositifs au VIH-1 par rapport aux sujets séronégatifs (185, 188) et d'autre part que l'isoforme la plus active de cette cytokine (IL-32 γ) est dotée d'un potentiel inducteur de molécules immunosuppressives (188). Le facteur de changement dans la figure 9 montre la diminution des isoformes alpha et delta de l'IL-32 chez 5 progresseurs lents au moment de la perte de contrôle de l'infection à VIH-1.

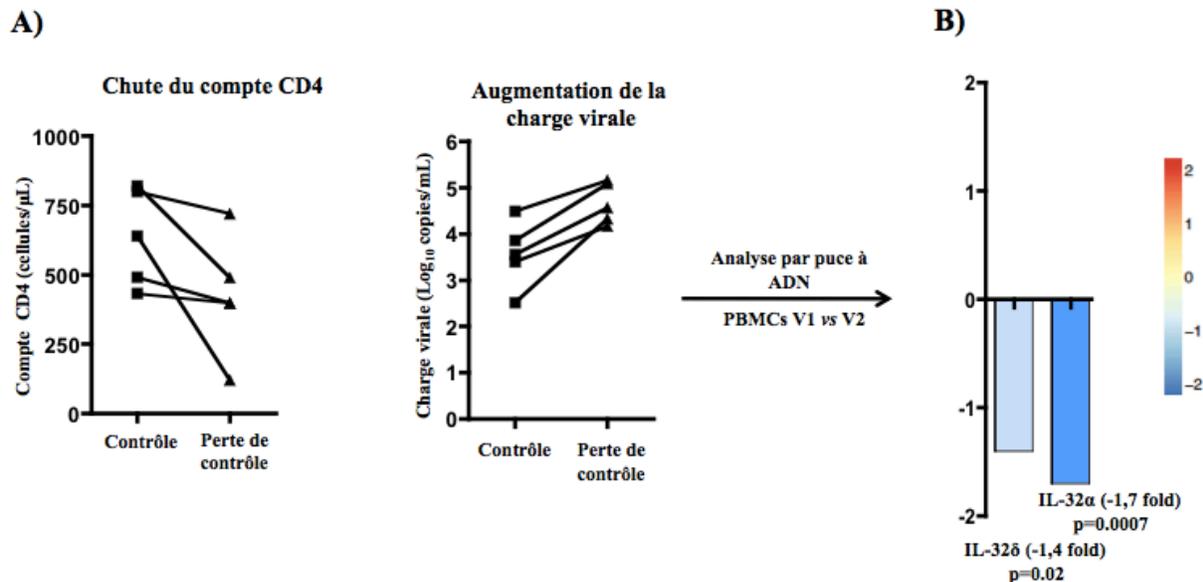


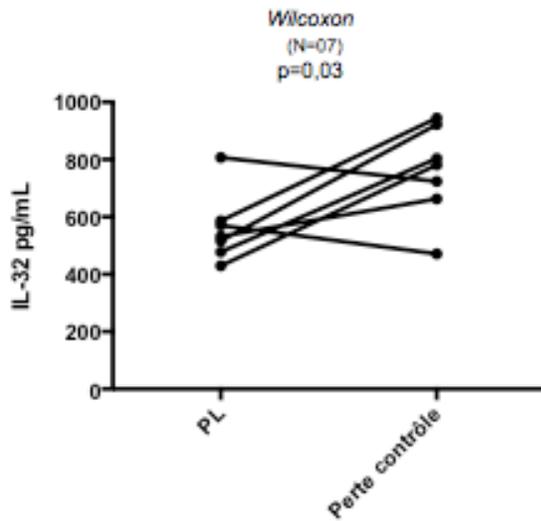
Figure 9. Analyse par puces à ADN de PBMC de 5 progresseurs lents. A) Données cliniques: visite 1 (V1) avant la perte de contrôle et visite 2 (V2) après la perte de contrôle avec 24 à 36 mois d'intervalle entre les visites, montrant le déclin du compte cellulaire CD4 (à gauche) et l'augmentation de la charge virale (à droite). B) Analyse par puces à ADN relevant une diminution significative des isoformes alpha et delta de l'IL-32 (et non de l'IL-32 total) chez les sujets en perte de contrôle de l'infection par rapport aux sujets encore en contrôle de l'infection.

4.2. Taux d'IL-32 total chez des progresseurs lents et après la perte de contrôle

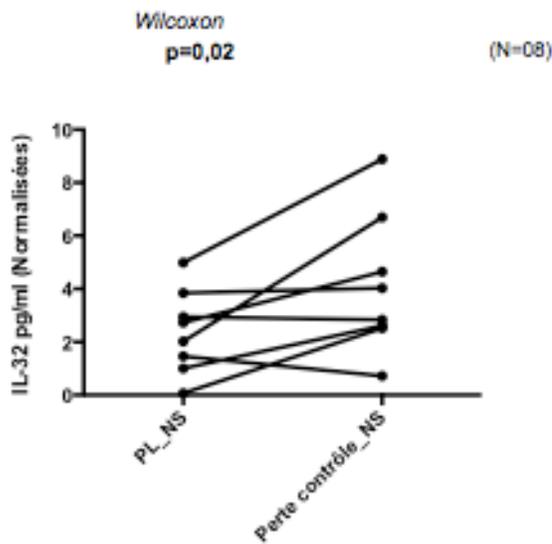
Afin d'apprécier les variations du taux d'IL-32 total au cours de la progression de l'infection à VIH-1, nous avons mesuré les concentrations de l'IL-32 total dans le plasma et le lysat de PBMC de progresseurs lents (PL). Ces taux ont été comparés à ceux dosés chez ces mêmes sujets plus tard au cours de la progression de l'infection.

Nos résultats (figure 10) montrent que les concentrations d'IL-32 total aussi bien dans le plasma que dans les lysats de PBMC augmentent lorsque les progresseurs lents sont en perte de contrôle de l'infection. En effet, les taux d'IL-32 total demeurent significativement plus élevés à la visite 2 comparativement à ceux de la visite 1 exceptés pour les cellules stimulées, probablement à cause d'un échantillon qui n'aurait pas répondu à la stimulation PHA+IL-2 (figure 10C). Les taux d'IL-32 total restent généralement plus élevés dans les lysats de PBMC après la stimulation PHA+IL-2 par rapport aux cellules non stimulées.

A)



B)



C)

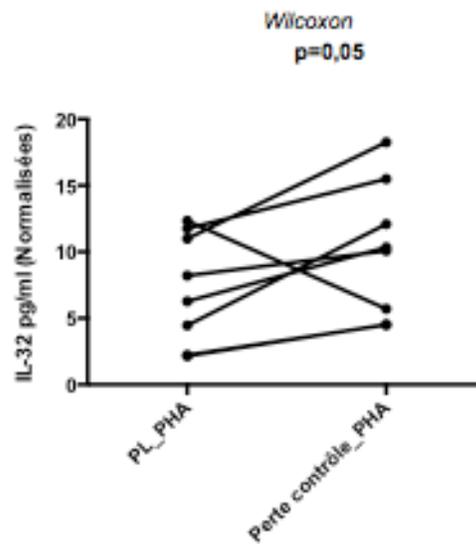


Figure 10. Le taux d'IL-32 total augmente lors de la perte de contrôle de l'infection à VIH-1. Le test *Wilcoxon* a été utilisé pour la comparaison entre les groupes. **A)** Le taux plasmatique d'IL-32 total est significativement plus élevé lors de la perte de contrôle. Les progressseurs lents (PL) ont un compte cellulaire CD4 moyen de 541 cellules/ μ L et une charge virale moyenne de 21024 copies/mL. À la perte de contrôle, le compte cellulaire CD4 moyen est de 352 cellules/ μ L et la charge virale moyenne de 47964 copies/mL. **B et C)** Le taux d'IL-32 total dans le lysat de PBMC demeure plus élevé lors de la perte de contrôle. Les PL ont un compte cellulaire CD4

moyen de 536 cellules/ μ L et la charge virale moyenne est de 23575 copies/mL. À la perte de contrôle, le compte cellulaire CD4 moyen est de 348 cellules/ μ L et la charge virale moyenne de 47192 copies/mL. NS=PBMC non stimulés. PHA=PBMC stimulées par le PHA+IL-2.

4.3. Isoforme alpha de l'interleukine-32

L'isoforme alpha constitue l'une des principales isoformes de l'interleukine-32. Elle demeure très peu impliquée dans la mort cellulaire et l'inflammation (158-160).

Ainsi, nous avons mesuré le taux de l'IL-32 α chez des donneurs VIH positif en comparaison avec des sujets VIH négatif.

Comme attendu, la figure 11 montrent que les taux plasmatiques d'IL-32 α des sujets VIH négatif demeurent significativement plus élevés que ceux des sujets VIH positif. Même si la différence n'est pas significative, on note une tendance à l'augmentation du taux d'IL-32 α chez les contrôleurs élités par rapport aux sujets virémiques.

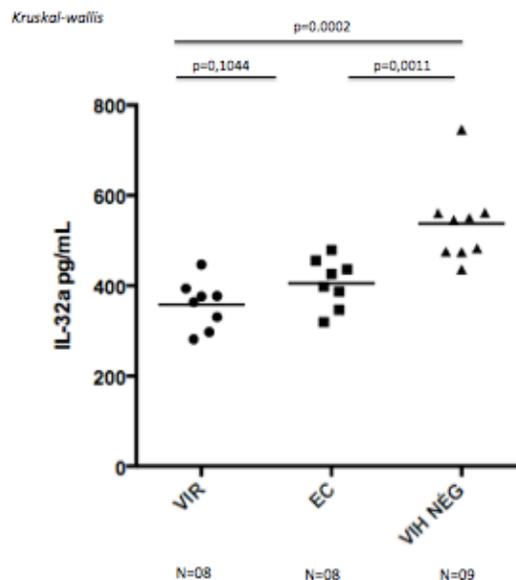


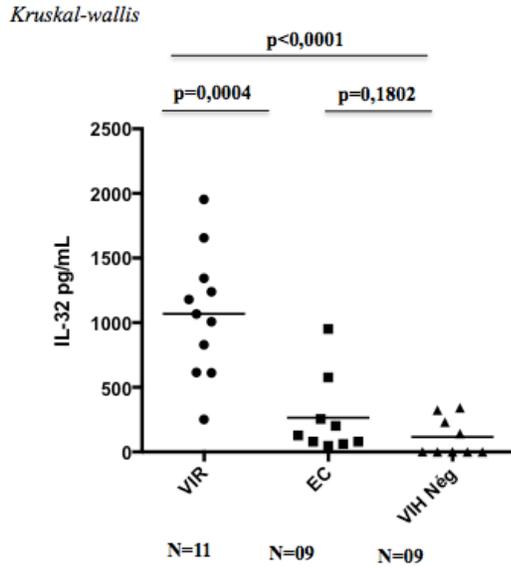
Figure 11. Le taux plasmatique d'IL-32 α mesuré chez les sujets VIH négatif est significativement plus élevé que celui des sujets VIH positif (VIR et EC). Les sujets virémiques ont une charge virale plasmatique moyenne de 99696 copies/mL et un compte

cellulaire T CD4 moyen de 406 cellules/ μ L. Les EC ont un compte cellulaire T CD4 moyen de 806 cellules/ μ L et une charge virale plasmatique moyenne <50 copies/mL. Le test *Kruskal-wallis* a été utilisé pour la comparaison entre les groupes.

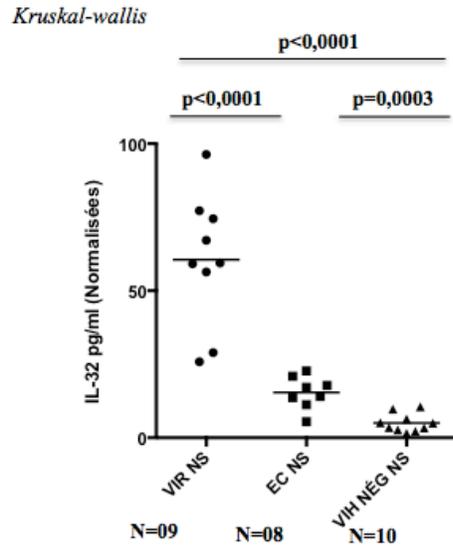
4.4. Comparaison des taux d'interleukine-32 total des séropositifs et VIH négatif

Des études préalables ont montré que le taux d'IL-32 total demeure plus élevé chez les sujets séropositifs par rapport aux sujets VIH négatif (180, 188). Nous avons obtenu des résultats similaires (figure 12) en plus de faire la distinction entre les taux d'IL-32 total au sein des sujets VIH positif (progresseurs lents et sujets virémiques). En effet, les taux plasmatiques d'IL-32 total des sujets virémiques sont significativement plus élevés que ceux des sujets contrôleurs élites, lesquels restent plus élevés que ceux des sujets VIH négatif (figure 12A). De façon intéressante, cette différence de concentration d'IL-32 total entre les contrôleurs élites et les sujets VIH négatif devient significative dans le lysat de PBMC (figures 12B et 12C). Les concentrations d'IL-32 total dans les lysats de PBMC des sujets VIH positif aussi bien pour les cellules stimulées que non stimulées sont toujours significativement plus élevées que celles des sujets VIH négatif. En fait, les taux pour les sujets virémiques demeurent significativement plus élevés que ceux des sujets contrôleurs élites lesquels restent également significativement plus élevés que ceux des sujets VIH négatif. De plus, les concentrations d'IL-32 total sont généralement plus élevées lorsque les cellules sont stimulées (figure 12C) comparativement les cellules non stimulées (figure 12B).

A)



B)



C)

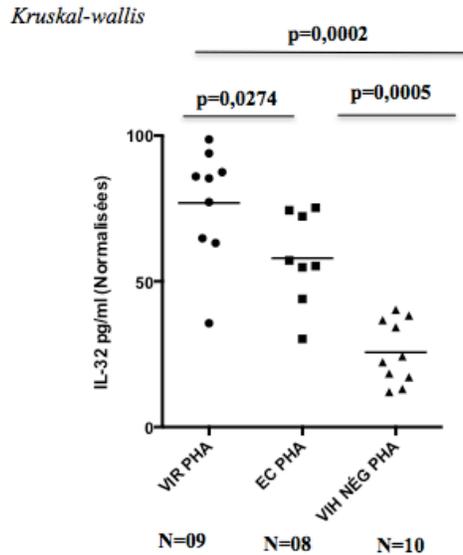


Figure 12. Le taux de l'IL-32 total est plus élevé chez les sujets VIH positif (EC et virémiques) par rapport à celui des sujets VIH négatif (VIH NÉG). Le test *Kruskal-wallis* a été utilisé pour la comparaison entre les groupes. A) Taux plasmatiques d'IL-32 total de sujets VIH négatif, contrôleurs élites et sujets virémiques. Les sujets virémiques ont une charge virale plasmatique moyenne de 115612 copies/mL et un compte cellulaire CD4 moyen de 366

cellules/ μ L. Les EC ont un compte cellulaire CD4 moyen de 834 cellules/ μ L et une charge virale moyenne <50 copies/mL. **B et C)** Taux d'IL-32 total dans les lysats de PBMC après 24h de culture. Les sujets virémiques ont une charge virale plasmatique moyenne de 91071 copies/mL et un compte cellulaire CD4 moyen de 382 cellules/ μ L. Les contrôleurs élités ont un compte cellulaire T CD4 moyen de 845 cellules/ μ L et une charge virale moyenne <50 copies/mL. NS=PBMC non stimulés. PHA=PBMC stimulées par le PHA+IL-2.

4.5. Suivi du taux d'interleukine-32 total suite à l'infection par le VIH-1

4.5.1. Infection *in vitro* de PBMC

Afin d'apprécier l'évolution du taux l'IL-32 total en réponse à l'infection par le VIH-1, nous avons infecté *in vitro* des PBMC stimulées ou non provenant de sujets VIH négatif et avons mesuré les quantités d'IL-32 total avant l'infection et trois jours après l'infection aussi bien dans les surnageants (figure 13A) que dans les lysats (figure 13B).

Les résultats révèlent que l'IL-32 total augmente trois jours après l'infection: L'infection par le VIH-1 induit une augmentation du niveau d'IL-32 total.

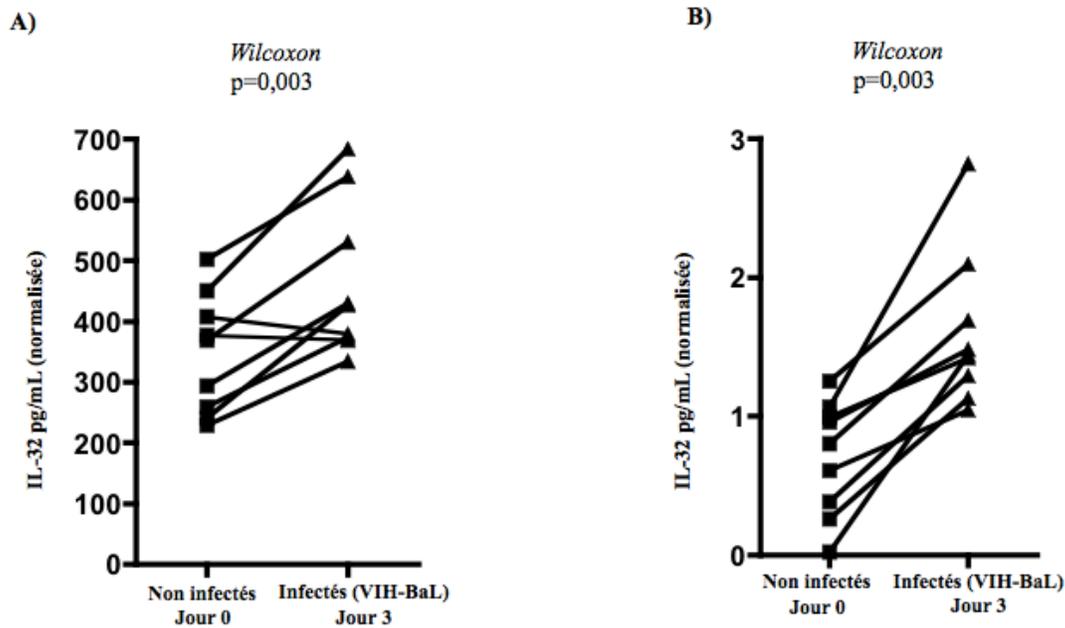


Figure 13. L'infection par le VIH induit l'augmentation de l'IL-32 total. **A)** Taux d' IL-32 total dans les surnageants de PBMC provenant de sujets VIH négatif (N=09) infectés *in vitro* par le VIH-BaL (50ng/10⁶ cellules) stimulés par du PHA+IL-2 pendant 72h. **B)** Taux d' IL-32 total dans des lysats de PBMC non stimulés provenant de sujets VIH négatif (N=09) infectés *in vitro* par le VIH-BaL (50ng/10⁶ cellules).

4.5.2. Infection *in vivo*

Nous avons mesuré le taux d'IL-32 total dans le plasma de sujets VIH positif en primo-infection et un an après que ces mêmes sujets aient reçu la thérapie antirétrovirale. Nous avons ensuite comparé les taux d'IL-32 total un an après le traitement avec ceux de sujets VIH négatif. Nos résultats suggèrent que les sujets VIH positif présentent des taux plasmatiques d'IL-32 total significativement plus élevés en phase de primo-infection comparativement aux taux mesurés chez ces mêmes sujets un an après la thérapie antirétrovirale (figure 14A). Par contre, cette chute drastique des concentrations d'IL-32 total un an après la thérapie antirétrovirale n'atteint jamais celles des sujets VIH négatif puisque les concentrations d'IL-32 total obtenues un an après la thérapie demeurent significativement plus élevées que celles des sujets VIH négatif (figure 14B). Il ressort ici que: 1) le niveau d'IL-32 total dans le plasma est au maximum en phase de primo-

infection, 2) la thérapie antirétrovirale diminue fortement le taux d'IL-32 total sans pour autant la ramener au niveau de celui des sujets VIH négatif.

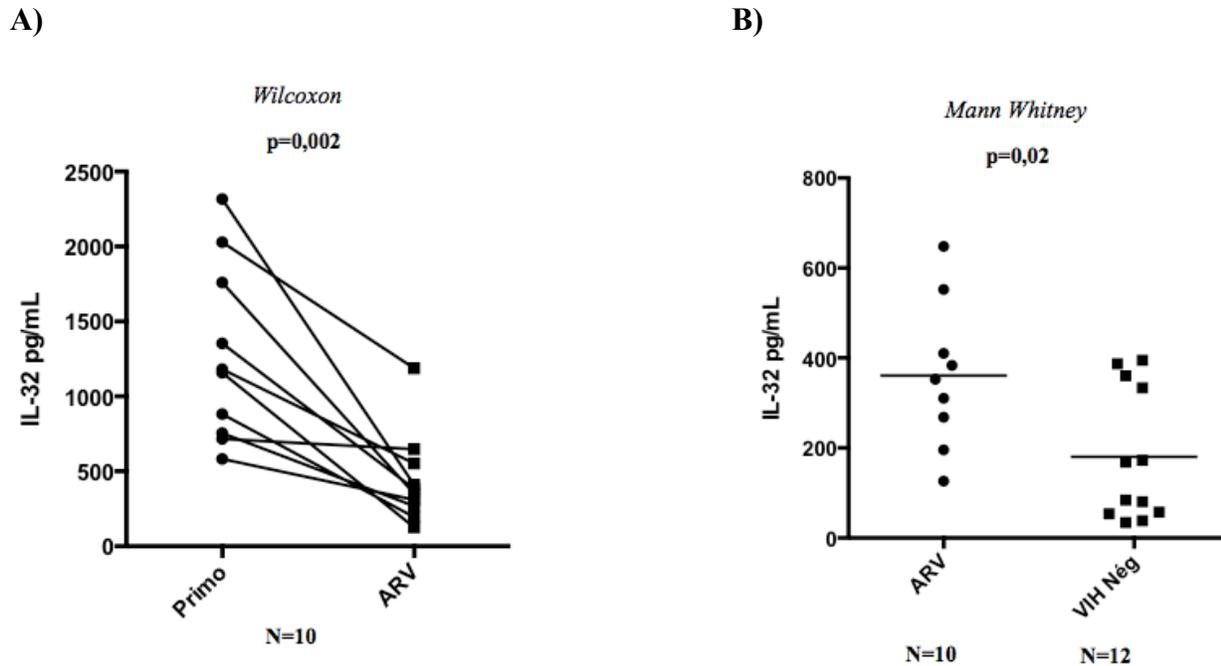


Figure 14. Suivi du taux d'IL-32 total dans le plasma chez un groupe de sujets VIH positif en primo-infection, un an après la thérapie antirétrovirale en comparaison avec des sujets VIH négatif. A) Le taux d'IL-32 total est significativement plus élevé en période de primo-infection (primo) par rapport à celui mesuré un an après la thérapie antirétrovirale (ARV) chez les sujets VIH positif. Le test *Wilcoxon* a été utilisé pour la comparaison entre les groupes. La charge virale moyenne en primo-infection est de 3712093 copies/mL et le compte cellulaire CD4 moyen est de 533 cellules/ μ L. Un an après la thérapie antirétrovirale, la charge virale moyenne est de 1149 copies/mL et le compte cellulaire CD4 moyen est de 610 cellules/ μ L **B)** Le taux d'IL-32 total demeure significativement plus élevé un an après thérapie antirétrovirale chez les sujets VIH positif par rapport à celui des sujets VIH négatif. Le test *Mann Whitney* a été utilisé pour la comparaison entre les groupes.

4.6. Évaluation du rôle de l'interleukine-32 dans la progression de l'infection à VIH-1

Nous avons déterminé le taux plasmatique d'IL-32 total de plusieurs sous-groupes de progresseurs lents décrits plus haut (EC, VC, NVC) que nous avons corrélé avec certains facteurs permettant d'apprécier la progression de l'infection à VIH-1.

4.6.1. Interleukine-32 et la charge virale

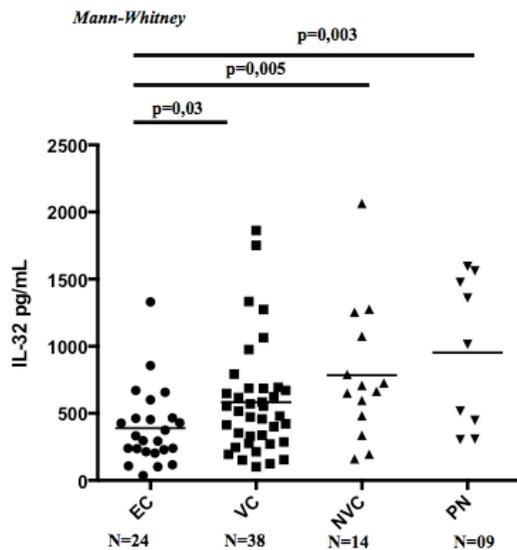
Nous avons comparé les taux plasmatiques d'IL-32 total entre les différents groupes de progresseurs lents (EC, VC, NVC) en comparaison avec les progresseurs normaux du VIH-1 (PN) (figure 15A): il apparaît ici que l'IL-32 total augmente significativement chez les sous-groupes de progresseurs lents ayant une charge virale de plus en plus élevée et demeure au maximum chez les progresseurs normaux utilisés ici comme contrôle.

Par la suite, nous avons corrélé les taux plasmatiques d'IL-32 total de tous les progresseurs lents avec la charge virale (figure 15B). Les résultats montrent qu'une augmentation de l'IL-32 total est associée à une élévation de la virémie. En fait, plus la concentration de l'IL-32 total plasmatique est élevée, plus la charge virale augmente aussi bien à la visite 1 (figure 15B) qu'à la visite 2 (figure 15C).

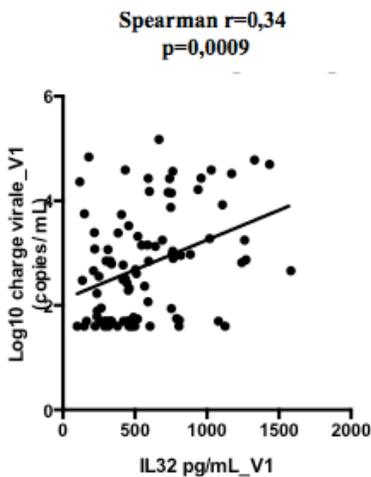
Comme attendu, les progresseurs lents ayant une concentration d'IL-32 total plasmatique élevée verront leur virémie augmentée à la visite 2 (figure 15D).

Il ressort ici qu': 1) une augmentation du taux plasmatique d'IL-32 total coïncide avec une hausse de la virémie. 2) une augmentation de l'IL-32 total plasmatique pourrait prédire une élévation de la charge virale.

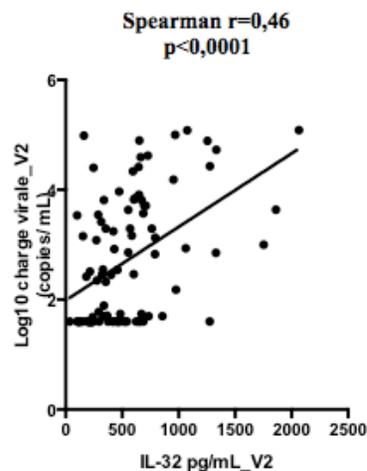
A)



B)



C)



D)

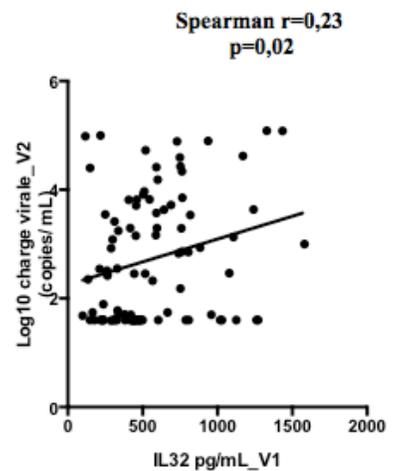


Figure 15. L'augmentation du taux plasmatique d'IL-32 total est associée à une augmentation de la charge virale. A) L'IL-32 total augmente de façon significative chez les sous-groupes de progressseurs lents ayant les charges virales les plus élevées. Les EC ont un compte cellulaire CD4 moyen de 628 cellules/ μ L et une charge virale moyenne <50 copies/mL. Les VC ont un compte cellulaire CD4 moyen de 624 cellules/ μ L et une charge virale moyenne de 3897 copies/mL. Les NVC ont un compte cellulaire CD4 moyen de 514 cellules/ μ L et une charge virale moyenne de 12366 copies/mL. Les PN ont un compte cellulaire CD4 moyen de 391 cellules/ μ L et une charge virale moyenne de 12242 copies/mL. Le test *Mann Whitney* a été utilisé

pour la comparaison entre les groupes. **B et C) L'IL-32 plasmatique corrèle positivement avec la charge virale (N=91).** Aussi bien à la visite 1 (figure 15B) qu'à la visite 2 (figure 15C), une augmentation de l'IL-32 total est associée à une augmentation de la charge virale. **D) L'augmentation de l'IL-32 total prédit une hausse de la charge virale (N=91)** (figure 15D). La charge virale moyenne, à la visite 1 est de 7745 copies/mL et le compte cellulaire CD4 moyen est de 660 cellules/ μ L. À la visite 2, la charge virale moyenne est de 10380 copies/mL et le compte cellulaire CD4 moyen est de 591 cellules/ μ L. Le test *Spearman* a été utilisé pour le calcul des *p-values*.

4.6.2. Interleukine-32 et compte cellulaire CD4

Toujours dans l'optique d'apprécier le rôle de l'interleukine-32 dans la progression de l'infection à VIH-1, nous avons corrélé le taux plasmatique d'IL-32 total à la visite 1 avec le compte cellulaire CD4 à la visite 2 chez des progresseurs lents. Nos résultats montrent que les progresseurs lents ayant un taux d'IL-32 total élevé auront une chute de leur compte cellulaire CD4 (figure 16).

Par conséquent, une augmentation du taux d'IL-32 total pourrait prédire une chute du compte cellulaire CD4 au cours de la progression de l'infection à VIH-1.

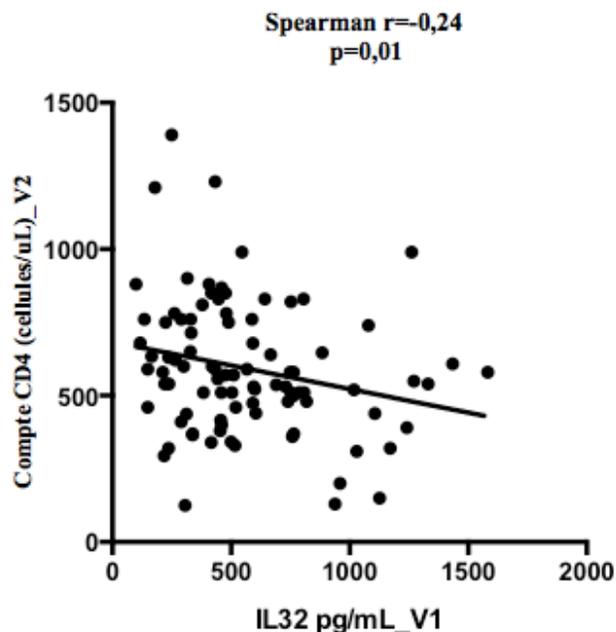


Figure 16. L'augmentation de l'IL-32 total plasmatique pourrait prédire une chute du compte cellulaire CD4 (N=91). La charge virale moyenne, à la visite 1 est de 7745 copies/mL et le compte cellulaire CD4 moyen est de 660 cellules/ μ L. À la visite 2, la charge virale moyenne est de 10380 copies/mL et le compte cellulaire CD4 moyen est de 591 cellules/ μ L. Le test *Spearman* a été utilisé pour le calcul des *p-values*.

4.6.3. Interleukine-32 et facteurs d'inflammation

Les intérêts pour l'étude de l'interleukine-32 ont grandit à l'issu de la découverte de ses propriétés biologiques particulièrement pro-inflammatoire. Nous avons, par conséquent, effectué des études de corrélation entre l'IL-32 et des facteurs d'inflammation que nous avons mis à profit dans la compréhension du rôle de cette interleukine dans la progression de l'infection à VIH-1.

4.6.3.1. Interleukine-32 et interleukine-6

L'interleukine-6 est une cytokine pro-inflammatoire dont l'augmentation du taux au cours de l'infection à VIH-1 a été rapportée dans une étude récente (216). Nous avons mesuré les taux plasmatiques d'IL-32 total chez les progressseurs lents que nous avons corrélés avec ceux de la cytokine pro-inflammatoire IL-6. Nos résultats suggèrent qu'une

augmentation de l'IL-32 total est associée à une hausse du taux d'IL-6 dans le plasma (figure 17A). Également, les progresseurs lents ayant un taux élevé d'IL-32 total dans le plasma à la visite 1 verront leur niveau d'IL-6 augmenté à la visite 2 (figure 17B). Par contre, une élévation du niveau plasmatique d'IL-6 ne prédit pas une hausse de celui de l'IL-32 (*p-value* non significatif) (figure 17C).

Il ressort ici que: 1) une augmentation du taux d'IL-32 total est associé à une hausse de la cytokine pro-inflammatoire IL-6 dans le plasma. 2) une augmentation du taux plasmatique d'IL-32 total pourrait annoncer une élévation du niveau d'IL-6. 3) À l'opposé, une hausse du taux plasmatique d'IL-6 ne prédit pas une augmentation de l'IL-32 total dans le plasma.

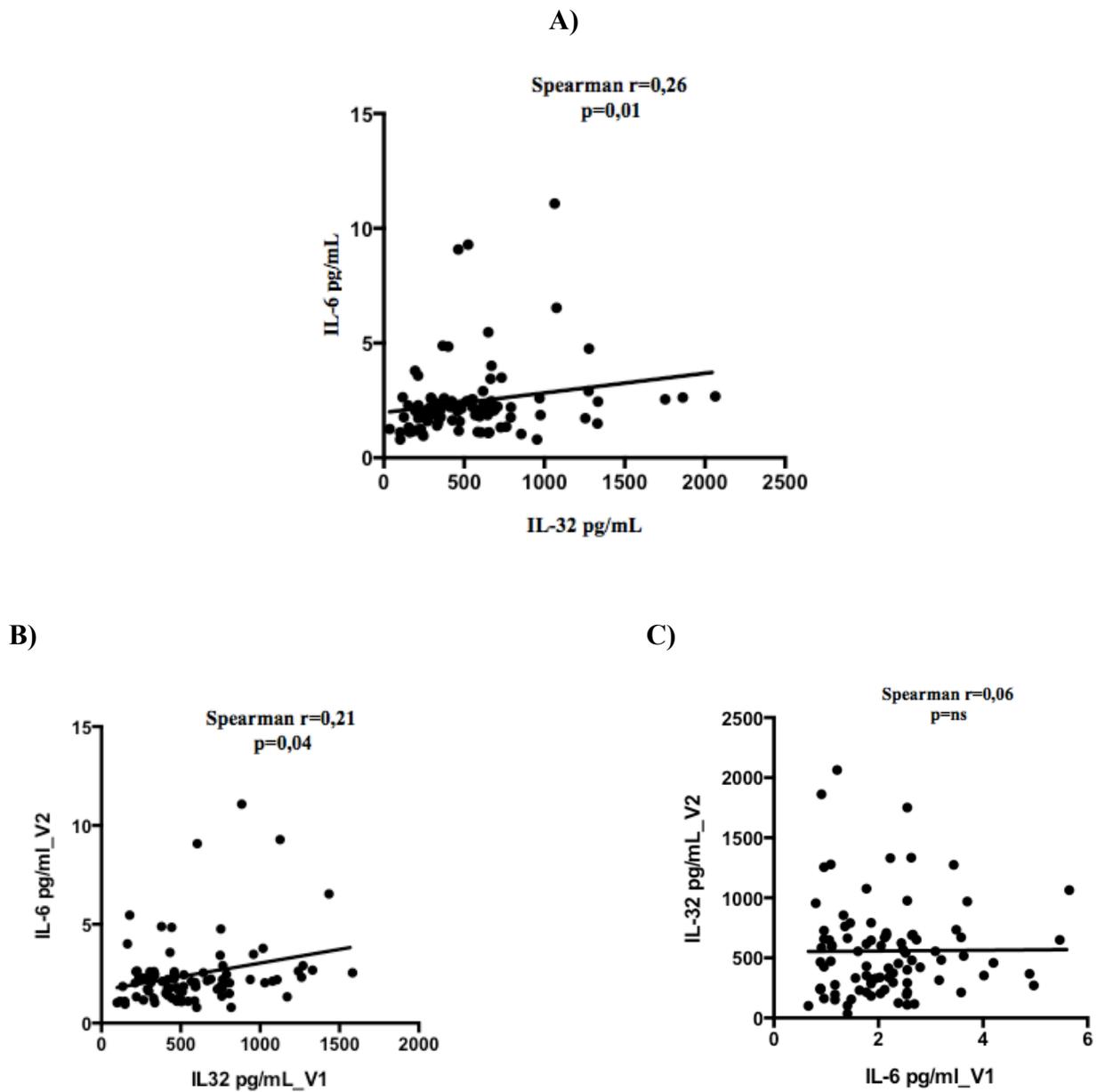


Figure 17. L'augmentation de IL-32 total plasmatique est associée à une augmentation de l'IL-6. Le test *Spearman* a été utilisé pour le calcul des *p-values*. A) L'IL-32 total corrèle positivement avec l'IL-6 au niveau plasmatique (N=90). La charge virale moyenne est de 10447 copies/mL et le compte cellulaire CD4 moyen est de 589 cellules/ μ L. B et C) L'augmentation de l'IL-32 total prédit une augmentation de l'IL-6 dans le plasma tandis qu'il n'existe pas de corrélation dans le cas inverse (*p-value* non significatif). B) N=90. À la visite 1, la charge virale moyenne est de 7816 copies/mL et le compte cellulaire CD4 moyen est de 660 cellules/ μ L. À la visite 2, La charge virale moyenne est de 10447 copies/mL et le compte

cellulaire CD4 moyen est de 589 cellules/ μ L. C) N=89. À la visite 1, la charge virale moyenne est de 7903 copies/mL et le compte cellulaire CD4 moyen est de 664 cellules/ μ L. À la visite 2, La charge virale moyenne est de 10564 copies/mL et le compte cellulaire CD4 moyen est de 594 cellules/ μ L.

4.6.3.2. Interleukine-32 et CD14 soluble

CD14 soluble est un facteur important permettant d'apprécier le niveau d'inflammation, la mortalité et la morbidité chez les sujets séropositifs (53).

Nous avons mesuré les taux plasmatiques d'IL-32 total chez les progresseurs lents que nous avons corrélés avec les taux de sCD14. La figure 18 montre que les taux plasmatiques d'IL-32 total corrélaient positivement avec ceux de sCD14 aussi bien à la visite 1 (figure 18A) qu'à la visite 2 (figure 18B). Ensuite, de façon intéressante, la figure 18C révèle qu'une augmentation du taux d'IL-32 à la visite 1 pourrait annoncer une hausse du taux de sCD14 à la visite 2. À contrario, une augmentation du taux de sCD14 à la visite 1 ne prédit pas une augmentation du taux d'IL-32 (figure 18D).

Il ressort ici que: 1) une augmentation du taux d'IL-32 total coïncide avec une hausse du taux de sCD14. 2) une augmentation du taux d'IL-32 total pourrait annoncer une élévation du niveau de sCD14. 3) À l'opposé, une hausse du taux plasmatique de sCD14 ne prédit pas une augmentation de l'IL-32 plasmatique.

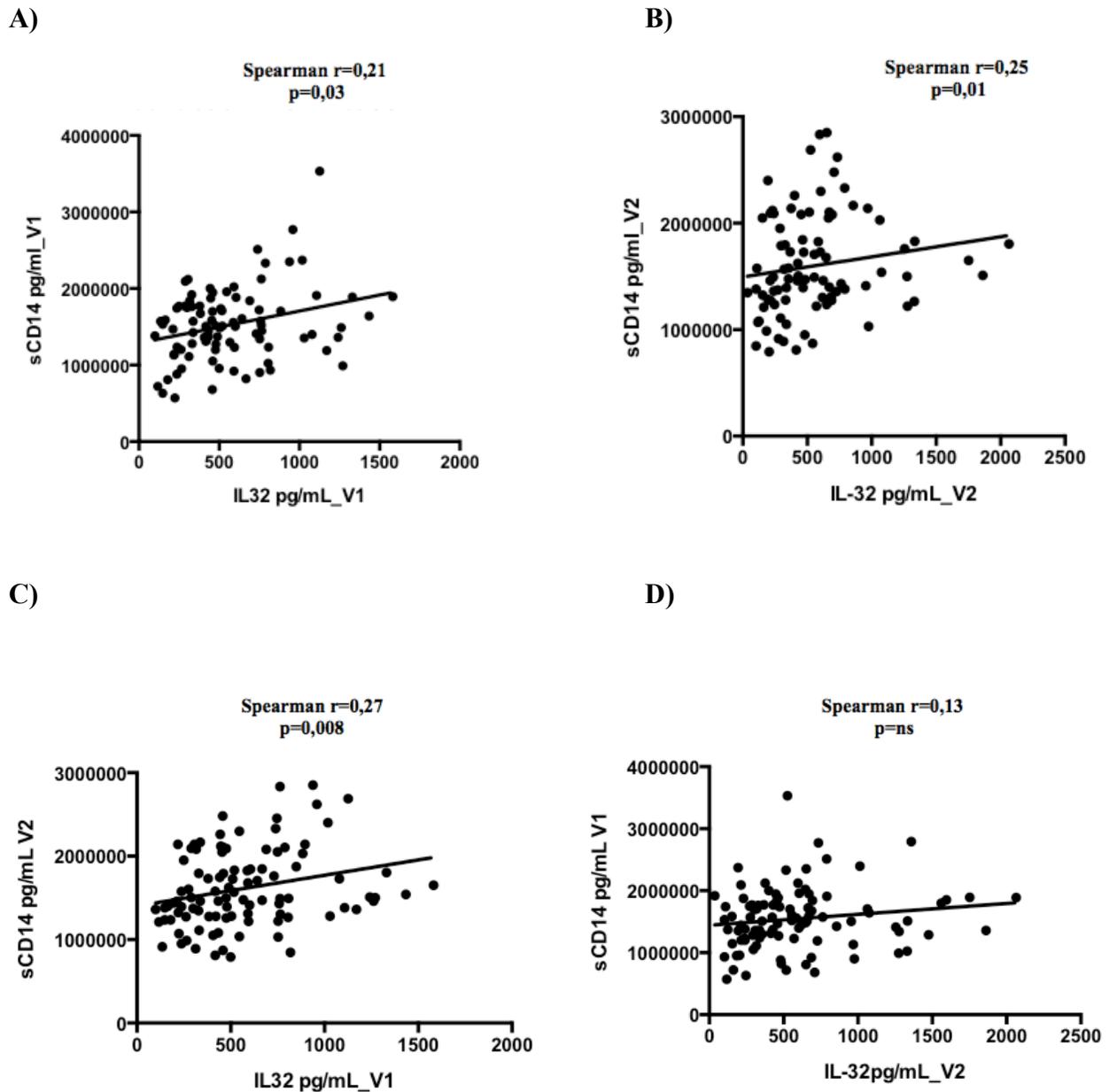


Figure 18. Corrélation entre les taux plasmatiques d'IL-32 total et sCD14 (N=91). La charge virale moyenne, à la visite 1 est de 7745 copies/mL et le compte cellulaire CD4 moyen est de 660 cellules/ μ L. À la visite 2, la charge virale moyenne est de 10380 copies/mL et le compte cellulaire CD4 moyen est de 591 cellules/ μ L. Le test *Spearman* a été utilisé pour le calcul des *p-values*. **A et B)** L'augmentation du taux d'IL-32 total corrèle positivement avec le taux de sCD14 aux visites 1 et 2. **C)** L'augmentation du taux d'IL-32 total pourrait prédire l'augmentation de

taux de sCD14. **D)** Inversement, une augmentation du taux de sCD14 à la visite 1 ne prédit pas l'augmentation du taux d'IL-32 à la visite 2 (*p-value* non significatif).

4.6.4. Corrélation entre l'interleukine-32 et CCL5

CCL5 est une chimiokine ligand naturel de CCR5, le corécepteur utilisé pour l'entrée des virus VIH-1 à tropisme R5. Il a été montré qu'avant l'infection, CCL5 inhibe l'entrée des souches R5 du VIH-1 par compétition au moment de la fixation à CCR5, utilisé comme corécepteur par le VIH-1 pour l'entrée des souches R5 (58, 66). En outre, l'activation du système immunitaire associée à l'infection par le VIH-1 entraîne une augmentation du taux de cette chimiokine (217) et il a été montré que les ligands de CCR5 peuvent augmenter la permissivité des souches X4 du VIH-1 (217, 218). Toutefois, dans le cas des progressseurs lents, l'activation du système immunitaire étant moindre au moment du contrôle de l'infection, il est possible de supposer que la chimiokine CCL5 demeure encore protectrice. De plus, il est démontré que les cellules T CD4+ de certains contrôleurs élités secrètent des quantités relativement élevées (supérieures à ceux des sujets séronégatifs au VIH) de ligands naturels de CCR5 bloquant ainsi l'entrée des souches R5 du VIH-1 (218).

Nous avons mesuré les taux plasmatiques d'IL-32 total chez les progressseurs lents que nous avons corrélés avec les taux de CCL5.

Nos résultats (figure 19) montrent que des taux plasmatiques élevés de CCL5 à la visite 1 (au moment du contrôle de l'infection) corrélaient négativement avec ceux d'IL-32 total à la visite 2. En fait, comme attendu, les progressseurs lents ayant une forte concentration de CCL5 à la visite 1 auront une faible concentration d'IL-32 total à la visite 2. Il ressort ici que, dans le plasma, plus il y a du CCL5, chimiokine limitant l'entrée des souches R5 du VIH-1 dans la cellule, moins il y aura de l'IL-32 total qui, selon nos résultats précédents, est associée à une augmentation de la virémie.

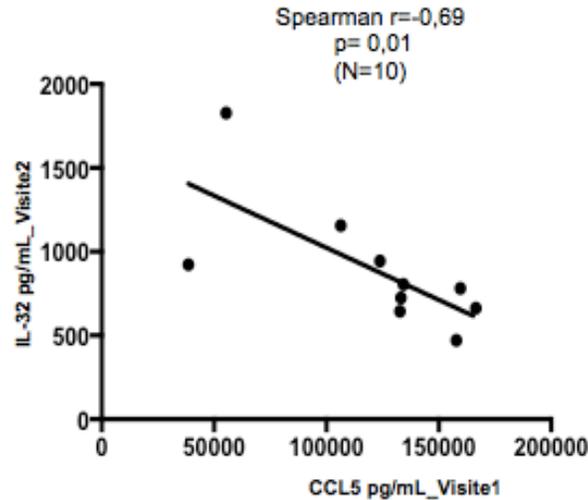


Figure 19. Un taux plasmatique élevé de CCL5 pourrait prédire une faible concentration plasmatique d’IL-32 total chez les progressseurs lents. La charge virale moyenne, à la visite 1 est de 23951 copies/mL et le compte cellulaire T CD4 moyen est de 575 cellules/ μ L. À la visite 2, la charge virale moyenne est de 57312 copies/mL et le compte cellulaire T CD4 moyen est de 387 cellules/ μ L. Le test *Spearman* a été utilisé pour le calcul du *p-value*.

4.7. Induction d’un milieu pro-inflammatoire par l’isoforme gamma

À l’opposé de l’isoforme alpha de l’IL-32, l’IL-32 γ est la plus active et demeure la plus impliquée dans la mort et l’activation cellulaire (158-160).

Les cellules T CD4 isolées de PBMC d’un donneur VIH négatif ont été stimulées et exposées ou non à l’IL-32 α ou IL-32 γ . Par la suite, plusieurs cytokines ont été mesurées. Les résultats soulignent que les cellules exposées à l’IL-32 γ sécrètent plus de cytokines pro-inflammatoires à savoir IL-6, IL-10, TNF α , IL-22 comparativement à celle exposées à l’IL-32 α . Il ressort ici que l’IL-32 γ contrairement à l’IL-32 α favorise l’établissement d’un milieu pro-inflammatoire et immunosuppresseur (figure 20).

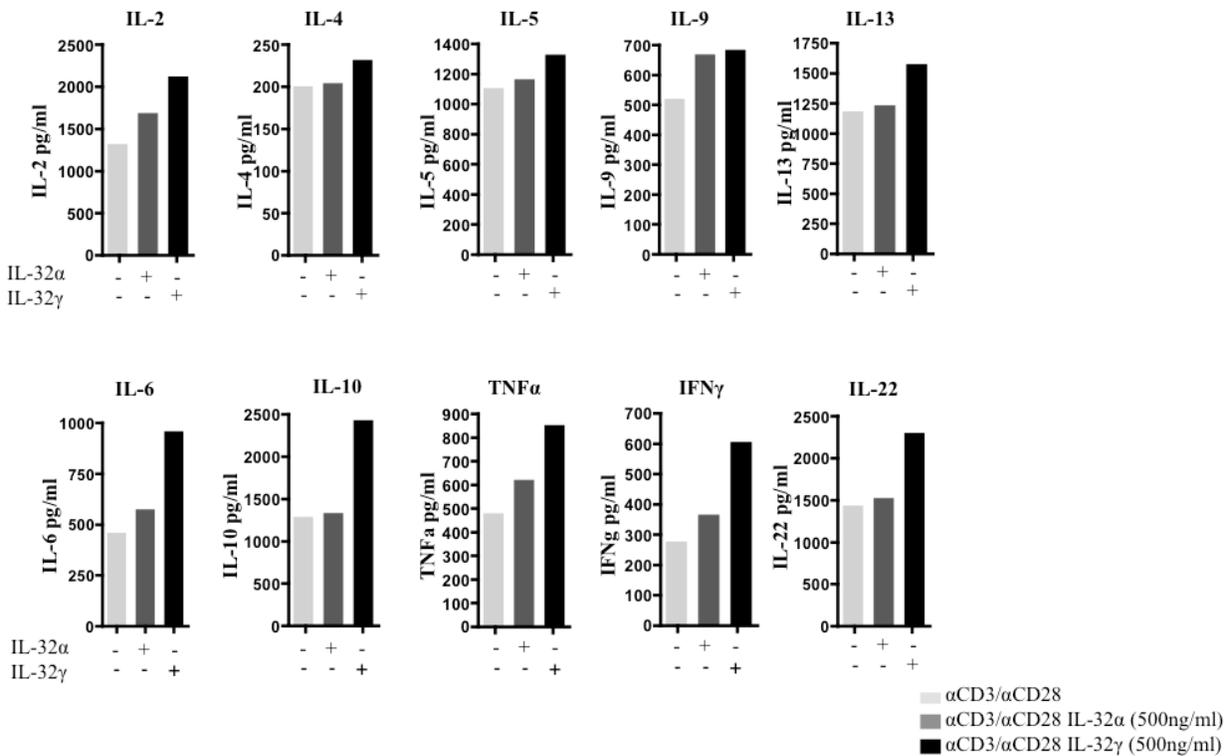


Figure 20. L'IL-32γ contrairement à l'IL-32α est associée à une augmentation du niveau d'inflammation. L'expérience a été effectuée sur un donneur. Les cellules T CD4 ont été isolées par sélection négative (*EasySep beads, StemCell*), stimulées par les anticorps anti-CD3 (0,5µg/mL) et anti-CD28 (0,5µg/mL) en présence ou non de IL-32α (500ng/mL) ou IL-32γ (500ng/mL). Les différentes cytokines ont été mesurées à jour 3 après la stimulation. L'IL-32γ mais non l'IL-32α induit un environnement pro-inflammatoire.

5. DISCUSSION

Des études antérieures ont souligné l'implication de l'IL-32 dans l'infection à VIH-1. Il est admis que le taux d'IL-32 est augmenté chez les sujets séropositifs pour le VIH-1 par rapport aux sujets VIH négatif (180). De plus, Smith et al. (188) soutient, dans son étude, que l'IL-32 γ induit l'immunosuppression favorisant un environnement propice à la réplication du VIH-1.

Similairement à ces observations, nos résultats suggèrent une association entre l'augmentation des taux d'IL-32 total et la progression de l'infection à VIH-1.

Nous avons comparé les taux d'IL-32 total de sujets VIH positif (contrôleurs élites et virémiques) et VIH négatif. Les résultats aussi bien dans le plasma que dans les lysats de PBMC ont permis de confirmer que le taux d'IL-32 total est significativement plus élevé chez les sujets séropositifs par rapport aux sujets VIH négatif (180). De plus, comme rapporté auparavant, nous avons observé que la stimulation par le PHA entraîne une augmentation des taux d'IL-32 total dans les lysats de PBMC après 24h de culture. De façon intéressante, nous avons distingué les contrôleurs élites des sujets virémiques. En fait, il est également ressorti de cette expérience que le taux d'IL-32 total des sujets virémiques demeure plus élevé que celui des contrôleurs élites. Dans le plasma, cette différence n'est pas significative mais le devient dans le lysat cellulaire. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que l'IL-32 est une cytokine principalement d'expression endogène (173) qui est donc plus facilement quantifiable dans le lysat cellulaire que dans le sang périphérique (ici représenté par le taux plasmatique). De plus, la forte concentration de l'IL-32 chez les sujets virémiques par rapport aux contrôleurs élites soutient l'argument selon lequel cette interleukine induit un environnement pro-inflammatoire, laquelle, est fortement observée chez les sujets virémiques.

Par ailleurs, nous avons montré que l'infection par le VIH-1 induit l'augmentation du niveau d'IL-32 total. En fait, l'infection *in vitro* de PBMC a permis d'observer une augmentation du niveau d'IL-32 total dans les surnageants de culture et lysat après 72 heures d'incubation à 37°C. Ces observations ont été confirmées *in vivo*. Nous avons, en effet, effectué un suivi longitudinal du taux plasmatique d'interleukine-32 total chez des sujets séropositifs en primo-infection, ensuite un an après la thérapie antirétrovirale en comparaison avec des sujets VIH négatif.

Comme attendu, le taux d'IL-32 total le plus élevé est observé en primo-infection et chute drastiquement dans le plasma lorsqu'on passe de la phase de primo-infection à un an après la thérapie antirétrovirale. En fait, durant la primo-infection, la forte virémie accompagnée de la cytolyse (expliquant entre autre la chute du compte cellulaire CD4) pourrait justifier cette forte concentration d'IL-32 total dans le plasma, étant donnée que cette cytokine d'expression principalement endogène verrait son taux plasmatique augmenté suite à une lyse cellulaire (174). Un an après la thérapie antirétrovirale, la baisse de la charge virale diminue la cytolyse, il y a une réduction de l'épuisement cellulaire qui amoindrit considérablement l'immunosuppression et favorise le rétablissement de la réponse immunitaire. Par conséquent, le taux d'IL-32 total diminue nettement dans le plasma. Toutefois, nos résultats ont révélé que cette diminution drastique du taux plasmatique d'IL-32 un an après la thérapie antirétrovirale n'atteint jamais celui des sujets VIH négatif utilisés comme contrôle. L'IL-32 pourrait ainsi représenter un biomarqueur permettant ici d'évaluer le bon fonctionnement du traitement antirétroviral.

L'augmentation du taux d'IL-32 total chez les sujets en perte de contrôle de l'infection à VIH-1 par rapport au taux obtenu chez ces mêmes sujets lorsqu'ils étaient en progression lente soutient nos résultats précédents selon lesquels le taux d'IL-32 total est augmentée en faveur de la progression de l'infection à VIH-1. L'augmentation du taux plasmatique de l'IL-32 total est associée ici à une perte de contrôle de l'infection à VIH-1.

Afin de mieux comprendre le rôle de l'IL-32 au cours de la progression de l'infection à VIH-1, nous avons entrepris, entre autres, des études de corrélations avec des marqueurs principaux de la progression de l'infection à VIH-1 à savoir la molécule sCD14 signant une translocation microbienne intestinale et associée à une augmentation de la mortalité chez les sujets VIH positif (53), le compte cellulaire T CD4⁺ et la charge virale. Le déclin du compte cellulaire CD4 associé à une augmentation de la charge virale corrèle avec un mauvais pronostic au cours de la progression de l'infection à VIH-1. En effet, nous avons mesuré les taux plasmatiques d'IL-32 total chez des sous-groupes de progresseurs lents (EC, VC, NVC) en comparaison avec des progresseurs normaux du VIH-1. Il est ressorti que l'IL-32 total augmente significativement et de plus en plus chez les sous-groupes de progresseurs lents ayant une virémie élevée. L'augmentation du taux plasmatique de l'IL-32 total coïncide avec une élévation de la charge

virale. Nous avons confirmé cette dernière observation par l'obtention de corrélation positive entre l'augmentation du taux plasmatique d'IL-32 total et la hausse de la charge virale. De façon intéressante, nous avons montré qu'une augmentation de l'IL-32 total dans le plasma pourrait prédire une hausse de la virémie au cours de la progression de l'infection à VIH-1 ainsi qu'un déclin du compte cellulaire CD4.

Également, une augmentation de l'IL-32 total coïncide avec la hausse du taux de la cytokine pro-inflammatoire IL-6 dans le plasma au cours de l'infection à VIH-1. Une étude récente a rapporté l'augmentation de l'IL-6 au cours de l'infection à VIH-1 (216). De plus, une élévation du niveau plasmatique d'IL-32 total pourrait prédire une augmentation de l'interleukine-6 plasmatique au cours de la progression de l'infection. Cependant, une augmentation de l'IL-6 plasmatique ne prédit pas une hausse de l'IL-32 dans le plasma.

Ensuite, nous avons corrélié les taux plasmatiques de l'IL-32 avec ceux de CD14 soluble (sCD14) qui est un marqueur important permettant d'apprécier le niveau d'inflammation, la mortalité et la morbidité chez les sujets séropositifs (53). Comme attendu, nous avons observé une corrélation positive entre les taux d'IL-32 total et de sCD14 aux visites 1 et 2 suggérant que plus la concentration de l'IL-32 total est augmentée, plus celle de sCD14 l'est également. De façon intéressante, une augmentation de l'IL-32 total à la visite 1 pourrait prédire une hausse du taux de sCD14 à la visite 2. Inversement, le taux de sCD14 à la visite 1 ne prédit pas une augmentation du taux d'IL-32 total à la visite 2 (*p-value* non significatif) attestant le sens unidirectionnel de cette corrélation.

Ainsi, nos résultats suggèrent que l'augmentation du taux plasmatique de l'IL-32 total coïncide avec une perte de contrôle de l'infection à VIH-1. Par conséquent, l'IL-32 pourrait constituer un biomarqueur permettant d'apprécier la progression de l'infection à VIH-1.

Toujours dans l'optique d'apprécier le rôle de l'interleukine-32 au cours de l'infection à VIH-1, nous avons corrélié les taux plasmatiques d'IL-32 total à ceux de CCL5, un ligand naturel de CCR5 utilisé comme corécepteur pour l'entrée des souches R5 du VIH-1. Il est connu qu'avant l'infection, les ligands naturels de CCR5, potentiellement CCL5, inhibent l'entrée des souches R5 du VIH-1 par compétition au moment de la fixation à CCR5 (58, 66). Même si, l'activation du système immunitaire durant l'infection à VIH-1 augmente le niveau de CCL5 (217) et que les ligands de CCR5 peuvent augmenter la permissivité des souches X4 du VIH-1 (217, 218) il est

démontré que les cellules T CD4⁺ de certains contrôleurs élités secrètent des quantités relativement élevées (supérieures à ceux des sujets séronégatifs au VIH) de ligands naturels de CCR5 bloquant l'entrée des souches R5 du VIH-1 (218).

Ainsi, dans le cas des progressions lentes, l'activation du système immunitaire étant moindre au moment du contrôle de l'infection, il est possible de supposer que la chimiokine CCL5 demeure encore protectrice. Nos résultats ont montré une corrélation négative entre le taux plasmatique de CCL5 à la visite 1 et celui de l'IL-32 total à la visite 2. Comme supposé, une concentration élevée de CCL5 pourrait prédire un taux faible d'IL-32 total. En fait, la chimiokine CCL5 inhibant l'entrée des souches R5 du VIH-1 par compétition va limiter l'entrée du virus dans la cellule. Or, nos résultats précédents associent l'augmentation de l'IL-32 total à une augmentation de la virémie. Ainsi, une forte concentration de CCL5 diminuerait la virémie et supposément le taux d'IL-32 total.

Nos résultats précédents ont permis d'évaluer le rôle de l'IL-32 total dans la progression de l'infection à VIH-1. Toutefois, il semble évident que les isoformes de l'IL-32 exercent des rôles différents dans la progression de l'infection à VIH-1. Ainsi, l'isoforme alpha de l'IL-32 (IL-32 α) s'est avéré être, en plus grande quantité dans le plasma des sujets VIH négatif que dans celui des sujets VIH positif (EC et virémique). De plus, même si la différence entre les élités contrôleurs et les sujets virémiques n'est pas significative, il apparaît une tendance à la hausse du taux plasmatique d'IL-32 α chez les contrôleurs élités par rapport aux sujets virémiques. Ces résultats confirment les données de la littérature selon lesquelles cette isoforme est la moins impliquée dans la mort cellulaire et l'inflammation (158-160). Le test ELISA que nous avons utilisé ne nous a pas permis de mesurer directement les taux d'IL-32 γ , ce qui pourrait être dû à des réactions croisées entre l'isoforme gamma et les autres analogues. Toutefois, nos résultats laissent supposer que l'IL-32 γ contrairement à l'IL-32 α est capable d'induire une hausse de la production de plusieurs cytokines pro-inflammatoires et entretenir ainsi un milieu immunosuppresseur propice à la réplication du VIH-1. L'IL-32 γ demeure la plus active et est la plus impliquée dans la mort et l'activation cellulaire (158-160) comparativement aux autres isoformes de l'IL-32. Nos observations soutiennent ceux de Smith et al. (188) selon lesquelles l'IL-32 γ induit l'immunosuppression favorisant la multiplication du VIH-1 et aussi ceux de Kang et al. attestant que l'IL-32 induit la production de cytokine immunosuppressive IL-10 (189). Nos résultats

précédents avaient également montré qu'une augmentation du taux plasmatique l'IL-32 total est associée à une hausse de l'IL-6 dans le plasma.

6. CONCLUSIONS-PERSPECTIVES

Les études concernant l'interleukine-32 ont connu de l'ampleur à partir de la découverte de ses propriétés biologiques, principalement pro-inflammatoire. Ainsi, plusieurs études ont montré l'implication de l'IL-32 dans différentes pathologies inflammatoires, cancéreuses et infectieuses (161, 163-166, 168).

Nos travaux sont les premiers à évaluer le rôle de l'IL-32 dans la progression de l'infection à VIH-1. Il ressort de nos travaux que:

#1) L'interleukine-32 total demeure plus élevé chez les séropositifs *versus* les sujets VIH négatif. De plus, les sujets virémiques ont un taux d'IL-32 plus élevé que les élites contrôleurs.

#2) L'augmentation du taux de l'interleukine-32 total coïncide avec une progression de l'infection à VIH-1.

#3) L'isoforme gamma, à l'opposé l'isoforme alpha, semble favoriser l'induction un environnement pro-inflammatoire.

Par ailleurs, nos résultats convergent vers le fait que l'augmentation du taux de l'IL-32 total est favorisée par une lyse cellulaire étant donné qu'elle est associée à une progression de l'infection à VIH-1 qui sous-entend une hausse de la virémie avec une lyse cellulaire. Il serait intéressant de poursuivre ce projet en testant l'impact de l'infection sur l'apoptose cellulaire et la relâche de l'IL-32 dans le milieu extracellulaire, étant donnée que cette cytokine serait libérée en grande quantité dans le plasma après lyse cellulaire (174). En effet, nos résultats ont démontré que les sujets virémiques avaient des taux plasmatiques d'IL-32 total plus élevés que ceux des sujets EC, ces derniers ayant des taux supérieurs à ceux des sujets VIH négatif. Ces données laissent supposer que les sujets virémiques ayant plus de cytolyse que les EC et les sujets VIH négatif pourraient de ce fait libérer l'IL-32 en plus grande quantité dans le milieu extracellulaire. En outre, les isoformes de l'interleukine-32 exercent des rôles différents dans la progression de l'infection à VIH-1. Il serait intéressant dans des expériences futures de réprimer l'expression d'au moins chacune des principales isoformes α , β , γ ou δ de l'IL-32 chez les sujets virémiques et les contrôleurs élites par des petits ARN interférents (*SiRNA* pour *Small Interfering RNA*) et mesurer la cinétique de la réplication virale après surinfection afin d'apprécier les propriétés spécifiques de chacune des isoformes de cette cytokine.

7. RÉFÉRENCES

1. Rapport mondial ONUSIDA 2014.
2. Castro, K. G., J. W. Ward, L. Slutsker, J. W. Buehler, H. W. Jaffe, and R. L. Berkelman. 1993. Revised classification system for HIV infection and expanded surveillance case definition for AIDS among adolescents and adults. Center for Disease Control, Atlanta.
3. Barre-Sinoussi, F., J. C. Chermann, F. Rey, M. T. Nugeyre, S. Chamaret, J. Gruest, C. Dauguet, C. Axler-Blin, F. Vezinet-Brun, C. Rouzioux, W. Rozenbaum, and L. Montagnier. 1983. Isolation of a T lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* 220: 868-871.
4. Montagnier, L., J. C. Chermann, F. Barre-Sinoussi, D. Klatzmann, S. Wain-Hobson, M. Alizon, F. Clavel, F. Brun-Vezinet, E. Vilmer, C. Rouzioux, et al. 1984. Lymphadenopathy associated virus and its etiological role in AIDS. *Princess Takamatsu Symp* 15: 319-331.
5. Popovic, M., M. G. Sarngadharan, E. Read, and R. C. Gallo. 1984. Detection, isolation, and continuous production of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and pre-AIDS. *Science* 224: 497-500.
6. Coffin, J., A. Haase, J. A. Levy, L. Montagnier, S. Oroszlan, N. Teich, H. Temin, K. Toyoshima, H. Varmus, P. Vogt, et al. 1986. Human immunodeficiency viruses. *Science* 232: 697.
7. Hill, M., G. Tachedjian, and J. Mak. 2005. The packaging and maturation of the HIV-1 Pol proteins. *Curr HIV Res* 3: 73-85.
8. Santiago, M. L., F. Range, B. F. Keele, Y. Li, E. Bailes, F. Bibollet-Ruche, C. Fruteau, R. Noe, M. Peeters, J. F. Brookfield, G. M. Shaw, P. M. Sharp, and B. H. Hahn. 2005. Simian immunodeficiency virus infection in free-ranging sooty mangabeys (*Cercocebus atys atys*) from the Tai Forest, Cote d'Ivoire: implications for the origin of epidemic human immunodeficiency virus type 2. *J Virol* 79: 12515-12527.
9. Jacques Pépin. 2012. The Origin of AIDS, chapitre 1. *Cambridge University Press*.
10. Wainberg, M. A. 2004. HIV-1 subtype distribution and the problem of drug resistance. *Aids* 18 Suppl 3: S63-68.
11. Greene, W. C., and B. M. Peterlin. 2002. Charting HIV's remarkable voyage through the cell:

Basic science as a passport to future therapy. *Nat Med* 8: 673-680.

12. Di Nunzio F, Felix T, Arhel N J, Nisole S, Charneau P, and Beignon A S. 2012. HIV-derived vectors for therapy and vaccination against HIV. *Vaccine*. 30: 2499-509.

13. Votteler, J., L. Neumann, S. Hahn, F. Hahn, P. Rauch, K. Schmidt, N. Studtrucker, S. M. Solbak, T. Fossen, P. Henklein, D. E. Ott, G. Holland, N. Bannert, and U. Schubert. 2011. Highly conserved serine residue 40 in HIV-1 p6 regulates capsid processing and virus core assembly. *Retrovirology* 8: 11.

14. Jeang, K.-T., ed. 2007. HIV-1: Molecular Biology and Pathogenesis: Viral Mechanisms, 2nd edition. *Elsevier*, San Diego, California.

15. Wagner, EK and Hewlett, MJ., Bloom, D.C., Camerini, D. 2008. Basic Virology, 3rd Ed. Chapitre 20. *Blackwell Sciences Ltd*.

16. Willey, R. L., F. Maldarelli, M. A. Martin, and K. Strebel. 1992. Human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein regulates the formation of intracellular gp160-CD4 complexes. *J Virol* 66: 226-234.

17. Nomaguchi, M., M. Fujita, and A. Adachi. 2008. Role of HIV-1 Vpu protein for virus spread and pathogenesis. *Microbes Infect* 10:960-967.

18. Flint et al. 2004. Principles of Virology, Chapitre 10, *ASM Press*.

19. Romani, B., and S. Engelbrecht. 2009. Human immunodeficiency virus type 1 Vpr: functions and molecular interactions. *J Gen Virol* 90:1795-1805.

20. Foster, J. L., and J. V. Garcia. 2008. HIV-1 Nef: at the crossroads. *Retrovirology* 5:84.

21. Berkhout, B., R. H. Silverman, and K. T. Jeang. 1989. Tat trans-activates the human immunodeficiency virus through a nascent RNA target. *Cell* 59:273-282.

22. Malim, M. H., J. Hauber, R. Fenrick, and B. R. Cullen. 1988. Immunodeficiency virus rev trans-activator modulates the expression of the viral regulatory genes. *Nature* 335:181-183.

23. Strauss, J.H. and Strauss, E.G. 2000. Viruses and human Diseases, Chapitre 5, *Academic Press*.

24. Klatzmann, D., E. Champagne, S. Chamaret, J. Gruest, D. Guetard, T. Hercend, J. C.

Gluckman, and L. Montagnier. 1984. T-lymphocyte T4 molecule behaves as the receptor for human retrovirus LAV. *Nature* 312: 767-768.

25. Maddon, P. J., A. G. Dalgleish, J. S. McDougal, P. R. Clapham, R. A. Weiss, and R. Axel. 1986. The T4 gene encodes the AIDS virus receptor and is expressed in the immune system and the brain. *Cell* 47: 333-348.

26. Stevenson, M. 2003. HIV-1 pathogenesis. *Nat Med* 9: 853-860.

27. Janeway, C. A., P. Travers, W. Mark, and S. Mark. 2001. Immunobiology. Chapitre 2 *Garland Science*, New York and London.

28. Berger, E. A., R. W. Doms, E. M. Fenyo, B. T. Korber, D. R. Littman, J. P. Moore, Q. J. Sattentau, H. Schuitemaker, J. Sodroski, and R. A. Weiss. 1998. A new classification for HIV-1. *Nature* 391: 240.

29. Feng, Y., C. C. Broder, P. E. Kennedy, and E. A. Berger. 1996. HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor. *Science* 272: 872-877.

30. Deng, H., R. Liu, W. Ellmeier, S. Choe, D. Unutmaz, M. Burkhart, P. Di Marzio, S. Marmon, R. E. Sutton, C. M. Hill, C. B. Davis, S. C. Peiper, T. J. Schall, D. R. Littman, and N. R. Landau. 1996. Identification of a major co receptor for primary isolates of HIV-1. *Nature* 381: 661-666.

31. Dragic, T., V. Litwin, G. P. Allaway, S. R. Martin, Y. Huang, K. A. Nagashima, C. Cayanan, P. J. Maddon, R. A. Koup, J. P. Moore, and W. A. Paxton. 1996. HIV-1 entry into CD4+ cells is mediated by the chemokine receptor CC-CKR-5. *Nature* 381: 667-673.

32. Nathanson, N. 2007. Viral Pathogenesis and Immunity, Chapter 3, *Elsevier*.

33. Freed, E. O., and A. J. Mouland. 2006. The cell biology of HIV-1 and other retroviruses. *Retrovirology* 3: 77.

34. Center, R. J., R. D. Leapman, J. Lebowitz, L. O. Arthur, P. L. Earl, and B. Moss. 2002. Oligomeric structure of the human immunodeficiency virus type 1 envelope protein on the virion surface. *J Virol* 76: 7863-7867.

35. Myszka, D. G., R. W. Sweet, P. Hensley, M. Brigham-Burke, P. D. Kwong, W. A. Hendrickson, R. Wyatt, J. Sodroski, and M. L. Doyle. 2000. Energetics of the HIV gp120-CD4 binding reaction. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 9026-9031.

36. Jones, P. L., T. Korte, and R. Blumenthal. 1998. Conformational changes in cell surface HIV-

1 envelope glycoproteins are triggered by cooperation between cell surface CD4 and co-receptors. *J Biol Chem* 273: 404-409.

37. Rizzuto, C. D., R. Wyatt, N. Hernandez-Ramos, Y. Sun, P. D. Kwong, W. A. Hendrickson, and J. Sodroski. 1998. A conserved HIV gp120 glycoprotein structure involved in chemokine receptor binding. *Science* 280: 1949-1953.

38. Sattentau, Q. J. 1992. CD4 activation of HIV fusion. *Int J Cell Cloning* 10: 323-332.

39. Chang, D. K., S. F. Cheng, and W. J. Chien. 1997. The amino-terminal fusion domain peptide of human immunodeficiency virus type 1 gp41 inserts into the sodium dodecyl sulfate micelle primarily as a helix with a conserved glycine at the micelle-water interface. *J Virol* 71: 6593-6602.

40. Melikyan, G. B., R. M. Markosyan, H. Hemmati, M. K. Delmedico, D. M. Lambert, and F. S. Cohen. 2000. Evidence that the transition of HIV-1 gp41 into a six-helix bundle, not the bundle configuration, induces membrane fusion. *J Cell Biol* 151: 413-423.

41. Telesnitsky, A., and S. P. Goff. 1997. Reverse Transcriptase and the Generation of Retroviral DNA. *Retroviruses*

42. Miller, M. D., C. M. Farnet, and F. D. Bushman. 1997. Human immunodeficiency virus type 1 preintegration complexes: studies of organization and composition. *J Virol* 71: 5382-5390.

43. Suhasini, M., and T. R. Reddy. 2009. Cellular proteins and HIV-1 Rev function. *Curr HIV Res* 7: 91-100.

44. McCune, J. M., L. B. Rabin, M. B. Feinberg, M. Lieberman, J. C. Kosek, G. R. Reyes, and I. L. Weissman. 1988. Endoproteolytic cleavage of gp160 is required for the activation of human immunodeficiency virus. *Cell* 53: 55-67.

45. Engelman A., Cherepanov P. 2012. The structural biology of HIV-1: mechanistic and therapeutic insights. *Nat Rev Microbiol.*; 10 (4):279-290.

46. Grossman, Z., M. Meier-Schellersheim, W. E. Paul, and L. J. Picker. 2006. Pathogenesis of HIV infection: what the virus spares is as important as what it destroys. *Nat Med* 12: 289-295.

47. Kahn, J. O., and B. D. Walker. 1998. Acute human immunodeficiency virus type 1 infection. *N Engl J Med* 339: 33-39.

48. Scarlatti, G., E. Tresoldi, A. Bjorndal, R. Fredriksson, C. Colognesi, H. K. Deng, M. S.

- Malnati, A. Plebani, A. G. Siccardi, D. R. Littman, E. M. Fenyo, and P. Lusso. 1997. In vivo evolution of HIV-1 coreceptor usage and sensitivity to chemokine-mediated suppression. *Nat Med* 3: 1259-1265.
49. Doms, R. W. 2001. Chemokine receptors and HIV entry. *Aids* 15 Suppl 1: S34-35.
50. Douek, D. C., L. J. Picker, and R. A. Koup. 2003. T cell dynamics in HIV-1 infection. *Annu Rev Immunol* 21: 265-304.
51. Qin, S., J. B. Rottman, P. Myers, N. Kassam, M. Weinblatt, M. Loetscher, A. E. Koch, B. Moser, and C. R. Mackay. 1998. The chemokine receptors CXCR3 and CCR5 mark subsets of T cells associated with certain inflammatory reactions. *J Clin Invest* 101: 746-754.
52. Vieillard, V., J. L. Strominger, and P. Debre. 2005. NK cytotoxicity against CD4+ T cells during HIV-1 infection: a gp41 peptide induces the expression of an NKp44 ligand. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 10981-10986.
53. Brenchley, J. M., D. A. Price, T. W. Schacker, T. E. Asher, G. Silvestri, S. Rao, Z. Kazzaz, E. Bornstein, O. Lambotte, D. Altmann, B. R. Blazar, B. Rodriguez, L. Teixeira-Johnson, A. Landay, J. N. Martin, F. M. Hecht, L. J. Picker, M. M. Lederman, S. G. Deeks, and D. C. Douek. 2006. Microbial translocation is a cause of systemic immune activation in chronic HIV infection. *Nat Med* 12: 1365-1371.
54. Leng, Q., G. Borkow, Z. Weisman, M. Stein, A. Kalinkovich, and Z. Bentwich. 2001. Immune activation correlates better than HIV plasma viral load with CD4 T-cell decline during HIV infection. *J Acquir Immune Defic Syndr* 27: 389-397.
55. Bofill, M., G. Janossy, C. A. Lee, D. MacDonald-Burns, A. N. Phillips, C. Sabin, A. Timms, M. A. Johnson, and P. B. Kernoff. 1992. Laboratory control values for CD4 and CD8 T lymphocytes. Implications for HIV-1 diagnosis. *Clin Exp Immunol* 88: 243-252.
56. Chu, C., and P. A. Selwyn. 2011. Complications of HIV infection: a systems-based approach. *Am Fam Physician* 83: 395-406.
57. ONUSIDA. 1999. Maladies opportunistes liées au VIH : Actualisation ONUSIDA. Genève.
58. Eger, K. A., and D. Unutmaz. 2005. The innate immune system and HIV pathogenesis. *Curr HIV/AIDS Rep* 2: 10-15.
59. Werling, D., and T. W. Jungi. 2003. TOLL-like receptors linking innate and adaptive immune

response. *Vet Immunol Immunopathol* 91: 1-12.

60. Ganz, T., M. E. Selsted, D. Szklarek, S. S. Harwig, K. Daher, D. F. Bainton, and R. I. Lehrer. 1985. Defensins. Natural peptide antibiotics of human neutrophils. *J Clin Invest* 76: 1427-1435.

61. Wang, W., S. M. Owen, D. L. Rudolph, A. M. Cole, T. Hong, A. J. Waring, R. B. Lal, and R. I. Lehrer. 2004. Activity of alpha- and theta-defensins against primary isolates of HIV-1. *J Immunol* 173: 515-520.

62. Mackewicz, C. E., J. Yuan, P. Tran, L. Diaz, E. Mack, M. E. Selsted, and J. A. Levy. 2003. alpha- Defensins can have anti-HIV activity but are not CD8 cell anti-HIV factors. *AIDS* 17: F23-32.

63. Nikolova, M., L. Bousnell, and A. Bensussan. 2001. The receptors regulating natural cytotoxic effector functions. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 49: 91-99.

64. Sawicki, M. W., N. Dimasi, K. Natarajan, J. Wang, D. H. Margulies, and R. A. Mariuzza. 2001. Structural basis of MHC class I recognition by natural killer cell receptors. *Immunol Rev* 181: 52-65.

65. Mavilio, D., J. Benjamin, M. Daucher, G. Lombardo, S. Kottlil, M. A. Planta, E. Marcenaro, C. Bottino, L. Moretta, A. Moretta, and A. S. Fauci. 2003. Natural killer cells in HIV-1 infection: dichotomous effects of viremia on inhibitory and activating receptors and their functional correlates. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 15011-15016.

66. Robertson, M. J. 2002. Role of chemokines in the biology of natural killer cells. *J Leukoc Biol* 71: 173- 183.

67. Younes, S. A., B. Yassine-Diab, A. R. Dumont, M. R. Boulassel, Z. Grossman, J. P. Routy, and R. P. Sekaly. 2003. HIV-1 viremia prevents the establishment of interleukin 2-producing HIV-specific memory CD4+ T cells endowed with proliferative capacity. *J Exp Med* 198: 1909-1922.

68. Zaunders, J. J., S. Ip, M. L. Munier, D. E. Kaufmann, K. Suzuki, C. Brereton, S. C. Sasson, N. Seddiki, K. Koelsch, A. Landay, P. Grey, R. Finlayson, J. Kaldor, E. S. Rosenberg, B. D. Walker, B. Fazekas de St Groth, D. A. Cooper, and A. D. Kelleher. 2006. Infection of CD127+ (interleukin-7 receptor+) CD4+ cells and overexpression of CTLA-4 are linked to loss of antigen-specific CD4 T cells during primary human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Virol* 80: 10162-10172.

69. Yue, F. Y., A. Merchant, C. M. Kovacs, M. Loutfy, D. Persad, and M. A. Ostrowski. 2008.

Virus-specific interleukin-17-producing CD4⁺ T cells are detectable in early human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Virol* 82: 6767-6771.

70. Paul, W. E., ed. 2003. *Fundamental Immunology*. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.

71. Oxenius, A., D. A. Price, P. J. Easterbrook, C. A. O'Callaghan, A. D. Kelleher, J. A. Whelan, G. Sontag, A. K. Sewell, and R. E. Phillips. 2000. Early highly active antiretroviral therapy for acute HIV-1 infection preserves immune function of CD8⁺ and CD4⁺ T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 3382-3387.

72. Douek, D. C., J. M. Brenchley, M. R. Betts, D. R. Ambrozak, B. J. Hill, Y. Okamoto, J. P. Casazza, J. Kuruppu, K. Kunstman, S. Wolinsky, Z. Grossman, M. Dybul, A. Oxenius, D. A. Price, M. Connors, and R. A. Koup. 2002. HIV preferentially infects HIV-specific CD4⁺ T cells. *Nature* 417: 95-98.

73. Zaunders, J. J., M. L. Munier, D. E. Kaufmann, S. Ip, P. Grey, D. Smith, T. Ramacciotti, D. Quan, R. Finlayson, J. Kaldor, E. S. Rosenberg, B. D. Walker, D. A. Cooper, and A. D. Kelleher. 2005. Early proliferation of CCR5(+) CD38(+++) antigenspecific CD4(+) Th1 effector cells during primary HIV-1 infection. *Blood*. 106:1660-1667.

74. Mohamed El-Far, Rabih Halwani, Elias Said, Lydie Trautmann, Mehrnoosh Doroudchi, Loury Janbazian, Simone Fonseca, Julien van Grevenynghe, Bader Yassine-Diab, Rafick-Pierre Sékaly, and Elias K. Haddad. 2008. T-cell Exhaustion in HIV Infection. *Current HIV/AIDS Reports* 5:13-19.

75. Day, C. L., D. E. Kaufmann, P. Kiepiela, J. A. Brown, E. S. Moodley, S. Reddy, E. W. Mackey, J. D. Miller, A. J. Leslie, C. DePierres, Z. Mncube, J. Duraiswamy, B. Zhu, Q. Eichbaum, M. Altfeld, E. J. Wherry, H. M. Coovadia, P. J. Goulder, P. Klenerman, R. Ahmed, G. J. Freeman, and B. D. Walker. 2006. PD-1 expression on HIV-specific T cells is associated with T-cell exhaustion and disease progression. *Nature* 443:350-354.

76. Kaufmann, D. E., and B. D. Walker. 2009. PD-1 and CTLA-4 inhibitory cosignaling pathways in HIV infection and the potential for therapeutic intervention. *J Immunol* 182:5891-5897.

77. Kaufmann, D. E., D. G. Kavanagh, F. Pereyra, J. J. Zaunders, E. W. Mackey, T. Miura, S. Palmer, M. Brockman, A. Rathod, A. Piechocka-Trocha, B. Baker, B. Zhu, S. Le Gall, M. T. Waring, R. Ahern, K. Moss, A. D. Kelleher, J. M. Coffin, G. J. Freeman, E. S. Rosenberg, and B. D. Walker. 2007. Upregulation of CTLA-4 by HIV-specific CD4⁺ T cells correlates with disease progression and defines a reversible immune dysfunction. *Nat Immunol* 8:1246-1254.

78. Migueles, S. A., C. M. Osborne, C. Royce, A. A. Compton, R. P. Joshi, K. A. Weeks, J. E. Rood, A. M. Berkley, J. B. Sacha, N. A. Cogliano-Shutta, M. Lloyd, G. Roby, R. Kwan, M. McLaughlin, S. Stallings, C. Rehm, M. A. O'Shea, J. Mican, B. Z. Packard, A. Komoriya, S. Palmer, A. P. Wiegand, F. Maldarelli, J. M. Coffin, J. W. Mellors, C. W. Hallahan, D. A. Follman, and M. Connors. 2008. Lytic granule loading of CD8+ T cells is required for HIV-infected cell elimination associated with immune control. *Immunity* 29: 1009-1021.
79. Koup, R. A., J. T. Safrit, Y. Cao, C. A. Andrews, G. McLeod, W. Borkowsky, C. Farthing, and D. D. Ho. 1994. Temporal association of cellular immune responses with the initial control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 syndrome. *J Virol* 68: 4650-4655.
80. Walker, B. D., S. Chakrabarti, B. Moss, T. J. Paradis, T. Flynn, A. G. Durno, R. S. Blumberg, J. C. Kaplan, M. S. Hirsch, and R. T. Schooley. 1987. HIV-specific cytotoxic T lymphocytes in seropositive individuals. *Nature* 328: 345-348.
81. Muller, P., M. Engelstadter, A. Werner, J. Braner, S. Staszewski, V. Miller, H. W. Doerr, R. Kurth, and K. Cichutek. 1997. Increased serum and mRNA levels of RANTES associated with elevated levels of activated CD8+CD38+ T cells in HIV-1 infected individuals. *Intervirology* 40: 263-270.
82. Cocchi, F., A. L. DeVico, A. Garzino-Demo, S. K. Arya, R. C. Gallo, and P. Lusso. 1995. Identification of RANTES, MIP-1 alpha, and MIP-1 beta as the major HIV-suppressive factors produced by CD8+ T cells. *Science* 270: 1811-1815.
83. Levy, J. A., C. E. Mackewicz, and E. Barker. 1996. Controlling HIV pathogenesis: the role of the noncytotoxic anti-HIV response of CD8+ T cells. *Immunol Today* 17:217-224.
84. Levy, J. A. 2003. The search for the CD8+ cell anti-HIV factor (CAF). *Trends Immunol* 24:628-632.
85. Goonetilleke, N., M. K. Liu, J. F. Salazar-Gonzalez, G. Ferrari, E. Giorgi, V. V. Ganusov, B. F. Keele, G. H. Learn, E. L. Turnbull, M. G. Salazar, K. J. Weinhold, S. Moore, N. Letvin, B. F. Haynes, M. S. Cohen, P. Hraber, T. Bhattacharya, P. Borrow, A. S. Perelson, B. H. Hahn, G. M. Shaw, B. T. Korber, and A. J. McMichael. 2009. The first T cell response to transmitted/founder virus contributes to the control of acute viremia in HIV-1 infection. *J Exp Med* 206:1253-1272.
86. Trautmann, L., L. Janbazian, N. Chomont, E. A. Said, S. Gimmig, B. Bessette, M. R. Boulassel, E. Delwart, H. Sepulveda, R. S. Balderas, J. P. Routy, E. K. Haddad, and R. P. Sekaly. 2006. Upregulation of PD-1 expression on HIV-specific CD8+ T cells leads to reversible immune dysfunction. *Nat Med* 12:1198-1202.

87. Petrovas, C., J. P. Casazza, J. M. Brenchley, D. A. Price, E. Gostick, W. C. Adams, M. L. Precopio, T. Schacker, M. Roederer, D. C. Douek, and R. A. Koup. 2006. PD-1 is a regulator of virus-specific CD8⁺ T cell survival in HIV infection. *J Exp Med* 203:2281-2292.
88. Stamatatos, L., L. Morris, D. R. Burton, and J. R. Mascola. 2009. Neutralizing antibodies generated during natural HIV-1 infection: good news for an HIV-1 vaccine? *Nat Med* 15:866-870.
89. Gray, E. S., P. L. Moore, I. A. Choge, J. M. Decker, F. Bibollet-Ruche, H. Li, N. Leseka, F. Treurnicht, K. Mlisana, G. M. Shaw, S. S. Karim, C. Williamson, and L. Morris. 2007. Neutralizing antibody responses in acute human immunodeficiency virus type 1 subtype C infection. *J Virol* 81:6187-6196.
90. McMichael, A. J., P. Borrow, G. D. Tomaras, N. Goonetilleke, and B. F. Haynes. 2010. The immune response during acute HIV-1 infection: clues for vaccine development. *Nat Rev Immunol* 10:11-23.
91. Tomaras, G. D., N. L. Yates, P. Liu, L. Qin, G. G. Fouda, L. L. Chavez, A. C. Decamp, R. J. Parks, V. C. Ashley, J. T. Lucas, M. Cohen, J. Eron, C. B. Hicks, H. X. Liao, S. G. Self, G. Landucci, D. N. Forthal, K. J. Weinhold, B. F. Keele, B. H. Hahn, M. L. Greenberg, L. Morris, S. S. Karim, W. A. Blattner, D. C. Montefiori, G. M. Shaw, A. S. Perelson, and B. F. Haynes. 2008. Initial B-cell responses to transmitted human immunodeficiency virus type 1: virion-binding immunoglobulin M (IgM) and IgG antibodies followed by plasma anti-gp41 antibodies with ineffective control of initial viremia. *J Virol* 82:12449-12463.
92. Kindt, T. J., Goldsby, R.A., Osborne, B.A., ed. 2008. Immunologie, 6e édition. Dunod, Paris.
93. Peter D. Kwong, John R. Mascola and Gary J. Nabel. 2013. Broadly neutralizing antibodies and the search for an HIV-1 vaccine: the end of the beginning. *Nature Rev. Immunol* 13:693-701.
94. De Milito, A. 2004. B lymphocyte dysfunctions in HIV infection. *Curr HIV Res* 2: 11-21.
95. Kolata, G. 1987. FDA approves AZT. *Science* 235: 1570.
96. Ezzell, C. 1987. AZT given the green light for clinical treatment of AIDS. *Nature* 326: 430
97. Ho, D. D. 1995. Time to hit HIV, early and hard. *N Engl J Med* 333: 450-451.
98. Ledergerber, B., M. Egger, M. Opravil, A. Telenti, B. Hirschel, M. Battegay, P. Vernazza, P. Sudre, M. Flepp, H. Furrer, P. Francioli, and R. Weber. 1999. Clinical progression and

virological failure on highly active antiretroviral therapy in HIV-1 patients: a prospective cohort study. Swiss HIV Cohort Study. *Lancet* 353: 863-868.

99. Sayana, S., and H. Khanlou. 2009. Maraviroc: a new CCR5 antagonist. *Expert Rev Anti Infect Ther* 7: 9-19.

100. Fatkenheuer, G., A. L. Pozniak, M. A. Johnson, A. Plettenberg, S. Staszewski, A. I. Hoepelman, M. S. Saag, F. D. Goebel, J. K. Rockstroh, B. J. Dezube, T. M. Jenkins, C. Medhurst, J. F. Sullivan, C. Ridgway, S. Abel, I. T. James, M. Youle, and E. van der Ryst. 2005. Efficacy of short-term monotherapy with maraviroc, a new CCR5 antagonist, in patients infected with HIV-1. *Nat Med* 11: 1170-1172.

101. Buzon, M. J., M. Massanella, J. M. Llibre, A. Esteve, V. Dahl, M. C. Puertas, J. M. Gatell, P. Domingo, R. Paredes, M. Sharkey, S. Palmer, M. Stevenson, B. Clotet, J. Blanco, and J. Martinez-Picado. 2010. HIV-1 replication and immune dynamics are affected by raltegravir intensification of HAART-suppressed subjects. *Nat Med* 16: 460-465.

102. Autran, B., G. Carcelain, T. S. Li, C. Blanc, D. Mathez, R. Tubiana, C. Katlama, P. Debre, and J. Leibowitch. 1997. Positive effects of combined antiretroviral therapy on CD4+ T cell homeostasis and function in advanced HIV disease. *Science* 277: 112-116.

103. Schmit, J. C., and B. Weber. 1997. Recent advances in antiretroviral therapy and HIV infection monitoring. *Intervirology* 40: 304-321.

104. Mathe, G. 1997. Hypothetical reasons of the HIV1-AIDS "tritherapy" failure. A challenging model. *Biomed Pharmacother* 51: 413-416.

105. Mikhail, M., Wang, B. & Saksena, N. K. 2003. Mechanisms involved in non-progressive HIV disease. *AIDS Rev* 5, 230-244.

106. Pantaleo, G. & Fauci, A. S. 1996. Immunopathogenesis of HIV infection. *Annu Rev Microbiol* 50, 825-854.

107. Hunt, P. W., Brenchley, J., Sinclair, E., McCune, J. M., Roland, M., Page-Shafer, K., Hsue, P., Emu, B., Krone, M. et al. 2008. Relationship between T cell activation and CD4+ T cell count in HIV-seropositive individuals with undetectable plasma HIV RNA levels in the absence of therapy. *J Infect Dis* 197, 126-133.

108. Okulicz, J. F., Marconi, V. C., Landrum, M. L., Wegner, S., Weintrob, A., Ganesan, A., Hale, B., Crum Cianfione, N., Delmar, J. et al. 2009. Clinical outcomes of elite controllers,

viremic controllers, and long-term nonprogressors in the US Department of Defense HIV Natural History Study. *J Infect Dis* 200, 1714–1723.

109. Saksena, N. K., Rodes, B., Wang, B. & Soriano, V. 2007. Elite HIV controllers: myth or reality? *AIDS Rev* 9, 195–207.

110. Alexander, L., Weiskopf, E., Greenough, T.C., Gaddis, N.C., Auerbach, M.R., Malim, M.H., O'Brien, S.J., Walker, B.D., Sullivan, J.L., and Desrosiers, R.C. 2000. Unusual polymorphisms in human immunodeficiency virus type 1 associated with nonprogressive infection. *J. Virol.* 74, 4361–4376.

111. Hassaine, G., Agostini, I., Candotti, D., Bessou, G., Caballero, M., Agut, H., Autran, B., Barthalay, Y., and Vigne, R. 2000. Characterization of human immunodeficiency virus type 1 vif gene in long-term asymptomatic individuals. *Virology* 276, 169–180.

112. Kirchhoff, F., Greenough, T.C., Brettler, D.B., Sullivan, J.L., and Desrosiers, R.C. 1995. Brief report: absence of intact nef sequences in a long-term survivor with non progressive HIV-1 infection. *N. Engl. J. Med.* 332, 228–232.

113. Lum, J.J., Cohen, O.J., Nie, Z., Weaver, J.G., Gomez, T.S., Yao, X.J., Lynch, D., Pilon, A.A., Hawley, N., Kim, J.E., et al. 2003. Vpr R77Q is associated with long-term nonprogressive HIV infection and impaired induction of apoptosis. *J. Clin. Invest.* 111, 1547–1554.

114. Wang, B., Ge, Y.C., Palasanthiran, P., Xiang, S.H., Ziegler, J., Dwyer, D.E., Randle, C., Dowton, D., Cunningham, A., and Saksena, N.K. 1996. Gene defects clustered at the C-terminus of the vpr gene of HIV-1 in long-term non-progressing mother and child pair: in vivo evolution of vpr quasispecies in blood and plasma. *Virology* 223, 224–232.

115. Yamada, T., and Iwamoto, A. 2000. Comparison of proviral accessory genes between long-term nonprogressors and progressors of human immunodeficiency virus type 1 infection. *Arch. Virol.* 145, 1021–1027.

116. Premkumar, D. R., Ma, X. Z., Maitra, R. K., Chakrabarti, B. K., Salkowitz, J., Yen-Lieberman, B., Hirsch, M. S. & Kestler, H. W. 1996. The nef gene from a long-term HIV type 1 nonprogressor. *AIDS Res Hum Retroviruses* 12, 337–345.

117. Tolstrup, M., Laursen, A. L., Gerstoft, J., Pedersen, F. S., Ostergaard, L. & Duch, M. 2006. Cysteine 138 mutation in HIV-1 Nef from patients with delayed disease progression. *Sex Health* 3, 281–286.

118. Blankson, J. N., Bailey, J. R., Thayil, S., Yang, H. C., Lassen, K., Lai, J., Gandhi, S. K.,

Siliciano, J. D., Williams, T. M. et al. 2007. Isolation and characterization of replication-competent human immunodeficiency virus type 1 from a subset of elite suppressors. *J Virol* 81, 2508–2518.

119. Dean, M., Carrington, M., Winkler, C., Huttley, G. A., Smith, M. W., Allikmets, R., Goedert, J. J., Buchbinder, S. P., Vittinghoff, E. et al. 1996. Genetic restriction of HIV-1 infection and progression to AIDS by a deletion allele of the *CKR5* structural gene. Hemophilia Growth and Development Study, Multicenter AIDS Cohort Study, Multicenter Hemophilia Cohort Study, San Francisco City Cohort, ALIVE Study. *Science* 273, 1856–1862.

120. Eugen-Olsen, J., Iversen, A. K., Garred, P., Koppelhus, U., Pedersen, C., Benfield, T. L., Sorensen, A. M., Katzenstein, T., Dickmeiss, E. et al. 1997. Heterozygosity for a deletion in the *CKR-5* gene leads to prolonged AIDS-free survival and slower CD4 T-cell decline in a cohort of HIV-seropositive individuals. *AIDS* 11, 305–310.

121. Misrahi, M., Teglas, J. P., N’Go, N., Burgard, M., Mayaux, M. J., Rouzioux, C., Delfraissy, J. F. & Blanche, S. 1998. *CCR5* chemokine receptor variant in HIV-1 mother-to-child transmission and disease progression in children. French Pediatric HIV Infection Study Group. *JAMA* 279, 277–280.

122. Romiti, M. L., Colognesi, C., Cancrini, C., Mas, A., Berrino, M., Salvatori, F., Orlandi, P., Jansson, M., Palomba, E. et al. 2000. Prognostic value of a *CCR5* defective allele in pediatric HIV-1 infection. *Mol Med* 6, 28–36.

123. Kalinkovich, A., Weisman, Z. & Bentwich, Z. 1999. Chemokines and chemokine receptors: role in HIV infection. *Immunol Lett* 68, 281–287.

124. Anzala, A. O., Ball, T. B., Rostron, T., O’Brien, S. J., Plummer, F. A. & Rowland-Jones, S. L. 1998. *CCR2*–64I allele and genotype association with delayed AIDS progression in African women. University of Nairobi Collaboration for HIV Research. *Lancet* 351, 1632–1633.

125. Vidal, F., Vilades, C., Domingo, P., Broch, M., Pedrol, E., Dalmau, D., Knobel, H., Peraire, J., Gutierrez, C. et al. 2005b. Spanish HIV-1-infected long-term nonprogressors of more than 15 years have an increased frequency of the *CX3CR1* 249I variant allele. *J Acquir Immune Defic Syndr* 40, 527–531.

126. Migueles, S. A. & Connors, M. 2010. Long-term nonprogressive disease among untreated HIV-infected individuals: clinical implications of understanding immune control of HIV. *JAMA* 304, 194–201.

127. Borrow P, Bhardwaj N. 2008. Innate immune responses in primary HIV-1 infection. *Curr*

Opin HIV AIDS, 3:36-44.

128. Meylan PR, Guatelli JC, Munis JR, Richman DD, Kornbluth RS 1993. Mechanisms for the inhibition of HIV replication by interferons-alpha -beta, and -gamma in primary human macrophages. *Virology*, 193:138-148.

129. Thibault S, Fromentin R, Tardif MR, Tremblay MJ. 2009. TLR2 and TLR4 triggering exerts contrasting effects with regard to HIV-1 infection of human dendritic cells and subsequent virus transfer to CD4+ T cells. *Retrovirology*, 6:42.

130. Soumelis, V., Scott, I., Gheyas, F., Bouhour, D., Cozon, G., Cotte, L., Huang, L., Levy, J.A., and Liu, Y.J. 2001. Depletion of circulating natural type 1 interferon-producing cells in HIV-infected AIDS patients. *Blood* 98, 906–912.

131. Stoddart CA, Keir ME, McCune JM. 2010. IFN-alpha-induced upregulation of CCR5 leads to expanded HIV tropism in vivo. *PLoS Pathog* , 6:e1000766.

132. Rotger M, Dang KK, Fellay J, Heinzen EL, Feng S, Descombes P, Shianna KV, Ge D, Gunthard HF, Goldstein DB et al. 2010. Genome-wide mRNA expression correlates of viral control in CD4+ T-cells from HIV-1-infected individuals. *PLoS Pathog*, 6:e1000781.

133. Ross SR. 2009. Are viruses inhibited by APOBEC3 molecules from their host species? *PLoS Pathog*, 5:e1000347.

134. Neil S, Bieniasz P. 2009. Human immunodeficiency virus, restriction factors, and interferon. *J Interferon Cytokine Res*, 29:569-580.

135. Vieillard, V., Fausther-Bovendo, H., Samri, A., Debré, P. & French Asymptomatiques à Long Terme (ALT) ANRS-CO15 Study Group. 2010. Specific phenotypic and functional features of natural killer cells from HIV-infected long-term non progressors and HIV controllers. *J Acquir Immune Defic Syndr* 53, 564–573.

136. O'Connor, G. M., Holmes, A., Mulcahy, F. & Gardiner, C. M. 2007. Natural killer cells from long-term non-progressor HIV patients are characterized by altered phenotype and function. *Clin Immunol* 124, 277–283.

137. Carrington M, Martin MP, van Bergen J. 2008. KIR-HLA intercourse in HIV disease. *Trends Microbiol*, 16:620-627.

138. Martin, M. P., Gao, X., Lee, J., Nelson, G. W., Detels, R., Goedert, J. J., Buchbinder, S.,

Hoots, K., Vlahov, D. et al. 2002. Epistatic interaction between KIR3DS1 and HLA-B delays the progression to AIDS. *Nat Genet* 31, 429–434.

139. Martin, M. P., Qi, Y., Gao, X., Yamada, E., Martin, J. N., Pereyra, F., Colombo, S., Brown, E. E., Shupert, L. W. et al. 2007. Innate partnership of HLA-B and KIR3DL1 subtypes against HIV-1. *Nat Genet* 39, 733–740.

140. Saez-Cirion A, Pancino G, Sinet M, Venet A, Lambotte O. 2007. HIV controllers: how do they tame the virus? *Trends Immunol*, 28:532-540.

141. 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, 1447–1450.

142. Deeks SG, Walker BD: Human immunodeficiency virus controllers 2007. Mechanisms of durable virus control in the absence of antiretroviral therapy. *Immunity*, 27:406-416.

143. Boaz, M. J., Waters, A., Murad, S., Easterbrook, P. J. & Vyakarnam, A. 2002. Presence of HIV-1 Gag-specific IFN- γ +IL-2+ and CD28+IL-2+ CD4 T cell responses is associated with non progression in HIV-1 infection. *J Immunol* 169, 6376–6385.

144. Saha, K., Bentsman, G., Chess, L. & Volsky, D. J. 1998. Endogenous production of beta-chemokines by CD4+, but not CD8+, T-cell clones correlates with the clinical state of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-infected individuals and may be responsible for blocking infection with non-syncytium-inducing HIV-1 in vitro. *J Virol* 72, 876–881.

145. Van Grevenynghe J, Procopio FA, He Z, Chomont N, Riou C, Zhang Y, Gimmig S, Boucher G, Wilkinson P, Shi Y et al. 2008. Transcription factor FOXO3a controls the persistence of memory CD4(+) T cells during HIV infection. *Nat Med*, 14:266-274.

146. Migueles, S. A. & Connors, M. 2001. Frequency and function of HIV-specific CD8+ T cells. *Immunol Lett* 79, 141–150.

147. Migueles SA, Laborico AC, Shupert WL, Sabbaghian MS, Rabin R, Hallahan CW, Van Baarle D, Kostense S, Miedema F, McLaughlin M et al. 2002. HIV-specific CD8+ T cell proliferation is coupled to perforin expression and is maintained in non-progressors. *Nat Immunol*, 3:1061-1068.

148. Saez-Cirion A, Lacabartz C, Lambotte O, Versmisse P, Urrutia A, Boufassa F, Barre-Sinoussi F, Delfraissy JF, Sinet M, Pancino G et al. 2007. HIV controllers exhibit potent CD8 T cell capacity to suppress HIV infection ex vivo and peculiar cytotoxic T lymphocyte activation

phenotype. *Proc Natl Acad Sci USA*, 104:6776-6781.

149. Saez-Cirion A, Sinet M, Shin SY, Urrutia A, Versmisse P, Lacabaratz C, Boufassa F, Avettand-Fenoel V, Rouzioux C, Delfraissy JF et al. 2009. Heterogeneity in HIV suppression by CD8 T cells from HIV controllers: association with Gag-specific CD8 T cell responses. *J Immunol*, 182:7828-7837.

150. Julg B, Williams KL, Reddy S, Bishop K, Qi Y, Carrington M, Goulder PJ, Ndung'u T, Walker BD. 2010. Enhanced anti-HIV functional activity associated with Gag-specific CD8 T-cell responses. *J Virol*, 84:5540-5549.

151. Betts MR, Nason MC, West SM, De Rosa SC, Migueles SA, Abraham J, Lederman MM, Benito JM, Goepfert PA, Connors M et al. 2006. HIV non-progressors preferentially maintain highly functional HIV-specific CD8+ T cells. *Blood*, 107:4781-4789.

152. Migueles SA, Weeks KA, Nou E, Berkley AM, Rood JE, Osborne CM, Hallahan CW, Cogliano-Shutta NA, Metcalf JA, McLaughlin M et al. 2009. Defective human immunodeficiency virus specific CD8+ T-cell polyfunctionality, proliferation, and cytotoxicity are not restored by antiretroviral therapy. *J Virol*, 83:11876-11889.

153. Wu, J. Q., Wang, B., Belov, L., Chrisp, J., Learmont, J., Dyer, W. B., Zaunders, J., Cunningham, A. L., Dwyer, D. E. et al. 2007. Antibody microarray analysis of cell surface antigens on CD4+ and CD8+ T cells from HIV+ individuals correlates with disease stages. *Retrovirology* 4, 83.

154. Emu B, Sinclair E, Hatano H, Ferre A, Shacklett B, Martin JN, McCune JM, Deeks SG. 2008. HLA class I-restricted T-cell responses may contribute to the control of human immunodeficiency virus infection, but such responses are not always necessary for long-term virus control. *J Virol*, 82:5398-5407.

155. Dahl CA, Schall RP, He HL, Cairns JS. 1992. Identification of a novel gene expressed in activated natural killer cells and T cells. *J Immunol* 148:597-603

156. Kim SH, Han SY, Azam T, Yoon DY, Dinarello CA. 2005. Interleukin-32: a cytokine and inducer of TNFalpha. *Immunity* 22:131-142

157. Goda C, Kanaji T, Kanaji S, Tanaka G, Arima K, Ohno S, Izuhara K. 2006. Involvement of IL-32 in activation-induced cell death in T cells. *Int Immunol* 18:233-240

158. Heinhuis B, Koenders MI, van de Loo FA, Netea MG, van den Berg WB, Joosten LA. 2011.

Inflammation-dependent secretion and splicing of IL-32 {gamma} in rheumatoid arthritis. *Proc Natl Acad Sci USA* 108:4962–4967

159. Heinhuis B, Netea MG, van den Berg WB, Dinarello CA, Joosten LA. 2012. Interleukin-32: a predominantly intracellular proinflammatory mediator that controls cell activation and cell death. *Cytokine* 60:321–327

160. Heinhuis B, Koenders MI, van den Berg WB, Netea MG, Dinarello CA, Joosten LA. 2012. IL-32 contains a typical alpha-helix bundle structure that resembles the focal adhesion targeting region of focal adhesion kinase-1. *J Biol Chem* 287:5733–5743

161. Bai X, Ovrutsky AR, Kartalija M, Chmura K, Kamali A, Honda JR, Oberley-Deegan RE, Dinarello CA, Crapo JD, Chang LY, Chan ED. 2011. IL-32 expression in the airway epithelial cells of patients with Mycobacterium avium complex lung disease. *Int Immunol* 23:679–691

162. Bai X, Kim SH, Azam T, McGibney MT, Huang H, Dinarello CA, Chan ED. 2010. IL-32 is a host protective cytokine against Mycobacterium tuberculosis in differentiated THP-1 human macrophages. *J Immunol* 184:3830–3840

163. Heinhuis B, Koenders MI, van Riel PL, van de Loo FA, Dinarello CA, Netea MG, van den Berg WB, Joosten LA. 2010. Tumour necrosis factor alpha-driven IL-32 expression in rheumatoid arthritis synovial tissue amplifies an inflammatory cascade. *Ann Rheum Dis* 70:660–667

164. Joosten LA, Netea MG, Kim SH, Yoon DY, Oppers-Walgreen B, Radstake TR, Barrera P, van de Loo FA, Dinarello CA, van den Berg WB. 2006. IL-32, a proinflammatory cytokine in rheumatoid arthritis. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:3298–3303

165. Kobayashi H, Yazlovitskaya EM, Lin PC. 2009. Interleukin-32 positively regulates radiation-induced vascular inflammation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 74:1573–1579

166. Kobayashi H, Lin PC. 2009. Molecular characterization of IL-32 in human endothelial cells. *Cytokine* 46:351–358

167. Marcondes AM, Li X, Tabellini L, Bartenstein M, Kabacka J, Sale GE, Hansen JA, Dinarello CA, Deeg HJ. 2011. Inhibition of IL-32 activation by alpha-1 antitrypsin suppresses alloreactivity and increases survival in an allogeneic murine marrow transplantation model. *Blood* 118:5031–5039

168. Marcondes AM, Mhyre AJ, Stirewalt DL, Kim SH, Dinarello CA, Deeg HJ. 2008. Dysregulation of IL-32 in myelodysplastic syndrome and chronic myelomonocytic leukemia

modulates apoptosis and impairs NK function. *Proc Natl Acad Sci USA* 105:2865–2870

169. Kang YH, Park MY, Yoon DY, Han SR, Lee CI, Ji NY, Myung PK, Lee HG, Kim JW, Yeom YI, Jang YJ, Ahn DK, Kim JW, Song EY. 2011. Dysregulation of overexpressed IL-32alpha in hepatocellular carcinoma suppresses cell growth and induces apoptosis through inactivation of NF-kappaB and Bcl-2. *Cancer Lett* 318:226–233

170. Sakitani K, Hirata Y, Hayakawa Y, Serizawa T, Nakata W, Takahashi R, Kinoshita H, Sakamoto K, Nakagawa H, Akanuma M, Yoshida H, Maeda S, Koike K. 2012. Role of interleukin-32 in Helicobacter pylori-induced gastric inflammation. *Infect Immun* 80:3795–3803

171. Sorrentino C, Di CE. 2009. Expression of IL-32 in human lung cancer is related to the histotype and metastatic phenotype. *Am J Respir Crit Care Med* 180:769–779

172. Nishida A, Andoh A, Inatomi O, Fujiyama Y. 2009. Interleukin- 32 expression in the pancreas. *J Biol Chem* 284:17868–17876

173. Hasegawa H, Thomas HJ, Schooley K, Born TL. 2011. Native IL-32 is released from intestinal epithelial cells via a non-classical secretory pathway as a membrane-associated protein. *Cytokine* 53:74–83

174. Joosten LA, Heinhuis B, Netea MG, Dinarello CA. 2013. Novel insights into the biology of interleukin-32. *Cell. Mol. Life Sci.* 70:3883–3892

175. Netea MG, Azam T, Lewis EC, Joosten LA, Wang M, Langenberg D, Meng X, Chan ED, Yoon DY, Ottenhoff T, Kim SH, Dinarello CA. 2006. Mycobacterium tuberculosis induces interleukin-32 production through a caspase- 1/IL-18/interferon-gamma-dependent mechanism. *PLoS Med* 3:e277

176. Schenk M, Krutzik SR, Sieling PA, Lee DJ, Teles RM, Ochoa MT, Komisopoulou E, Sarno EN, Rea TH, Graeber TG, Kim S, Cheng G, Modlin RL. 2012. NOD2 triggers an interleukin-32-dependent human dendritic cell program in leprosy. *Nat Med* 18:555–563

177. Xu Q, Pan X, Shu X, Cao H, Li X, Zhang K, Lu J, Zou Y, Li X, Liu H, Zhang Y, Yang D, Ning Q, Shen G, Li G. 2012. Increased interleukin- 32 expression in chronic hepatitis B virus-infected liver. *J Infect* 65:336–342

178. Li W, Sun W, Liu L, Yang F, Li Y, Chen Y, Fang J, Zhang W, Wu J, Zhu Y. 2010. IL-32: a host proinflammatory factor against influenza viral replication is upregulated by aberrant epigenetic modifications during influenza A virus infection. *J Immunol* 185:5056–5065

179. Li W, Yang F, Liu Y, Gong R, Liu L, Feng Y, Hu P, Sun W, Hao Q, Kang L, Wu J, Zhu Y. 2009. Negative feedback regulation of IL-32 production by iNOS activation in response to dsRNA or influenza virus infection. *Eur J Immunol* 39:1019–1024
180. Rasool ST, Tang H, Wu J, Li W, Mukhtar MM, Zhang J, Mu Y, Xing HX, Wu J, Zhu Y. 2008. Increased level of IL-32 during human immunodeficiency virus infection suppresses HIV replication. *Immunol Lett* 117:161–167
181. Park MH, Song MJ, Cho MC, Moon DC, Yoon DY, Han SB, Hong JT. 2012. Interleukin-32 enhances cytotoxic effect of natural killer cells to cancer cells via activation of death receptor 3. *Immunology* 135:63–72
182. Qu Y, Taylor JL, Bose A, Storkus WJ. 2011. Therapeutic effectiveness of intratumorally delivered dendritic cells engineered to express the pro-inflammatory cytokine, interleukin (IL)-32. *Cancer Gene Ther* 18:663–673
183. Jung MY, Son MH, Kim SH, Cho D, Kim TS. 2011. IL-32 $\{\gamma\}$ induces the maturation of dendritic cells with Th1- and Th17-polarizing ability through enhanced IL-12 and IL-6 production. *J Immunol* 186:6848–6859
184. Hong J, Bae S, Kang Y, Yoon D, Bai X, Chan ED, Azam T, Dinarello CA, Lee S, Her E, Rho G, Kim S. 2010. Suppressing IL-32 in monocytes impairs the induction of the proinflammatory cytokines TNF α and IL-1 β . *Cytokine* 49:171–176
185. Nold MF, Nold-Petry CA, Pott GB, Zepp JA, Saavedra MT, Kim SH, et al. 2008. Endogenous IL-32 controls cytokine and HIV-1 production. *J Immunol*; 181:557–65.
186. Sabbah A, Chang TH, Harnack R, Frohlich V, Tominaga K, Dube PH, et al. 2009. Activation of innate immune antiviral responses by NOD-2. *Nat Immunol* 10:1073–80.
187. Monteleone K, Di Maio P, Cacciotti G, Falasca F, Fraulo M, Falciano M, Mezzaroma I, D’Ettore G, Turriziani O, Scagnolari C. 2014. Interleukin-32 isoforms: expression, interaction with interferon-regulated genes and clinical significance in chronically HIV-1-infected patients. *Med Microbiol Immunol* 203:207–216
188. Smith JA, Toledo MC, Wietgreffe WS, Duan L, Schacker WT, Reilly SC and Haase TA. 2011. The Immunosuppressive Role of IL-32 in Lymphatic Tissue during HIV-1 Infection. *J Immunol* 186:6576-6584
189. Kang, J. W., S. C. Choi, M. C. Cho, H. J. Kim, J. H. Kim, J. S. Lim, S. H. Kim, J. Y. Han,

and D. Y. Yoon. 2009. A proinflammatory cytokine interleukin-32b promotes the production of an anti-inflammatory cytokine interleukin-10. *Immunology* 128 (1 Suppl): e532–e540.

190. Mellor, A. L., and D. H. Munn. 2004. IDO expression by dendritic cells: tolerance and tryptophan catabolism. *Nat. Rev. Immunol.* 4: 762–774.

191. Kang, J.W., Park, Y.S., Lee, D.H., Kim, M.S., Bak, Y., Ham, S.Y., Park, S.H., Kim, H., Ahn, J.H., Hong, J.T., et al. 2014. Interaction network mapping among IL-32 isoforms. *Biochimie* 101: 248-251.

192. Holl V, Peressin M, Moog C. 2009. Antibody-mediated Fc gamma receptor-based Mechanisms of HIV inhibition: recent findings and new vaccination strategies. *Viruses* 1:1265–94.

193. Lyerly HK, Matthews TJ, Langlois AJ, Bolognesi DP, Weinhold KJ. 1987. Human T-cell Lymphotropic virus IIIB glycoprotein (gp120) bound to CD4 determinant on Normal lymphocytes and expressed by infected cells serves as target for immune attack. *Proc Natl Acad Sci USA* 84:4601–5.

194. Forthal DN, Moog C. 2009. Fc receptor-mediated antiviral antibodies. *Curr Opin HIV AIDS* 4:388–93.

195. Trinchieri G, Valiante N. 1993. Receptors for the Fc fragment of IgG on natural killer cells. *Nat Immun* 12:218–34.

196. Ahmad A, Menezes J. 1996. Antibody-dependent cellular cytotoxicity in HIV infections. *FASEBJ* 10:258–66.

197. Alter G, Altfeld M. 2009. NK cells in HIV-1 infection. Evidence for their role in the control of HIV-1 infection. *J Intern Med* 265:29–42.

198. Berger CT, Alter G. 2011. Natural killer cells in spontaneous control of HIV infection. *Curr Opin HIV AIDS* 6:208–13.

199. Smalls-Mantey A, Connors M, Sattentau QJ. 2013. Comparative efficiency of HIV-1-infected T cell killing by NK cells, monocytes and neutrophils. *PLoS One* 8:e74858.

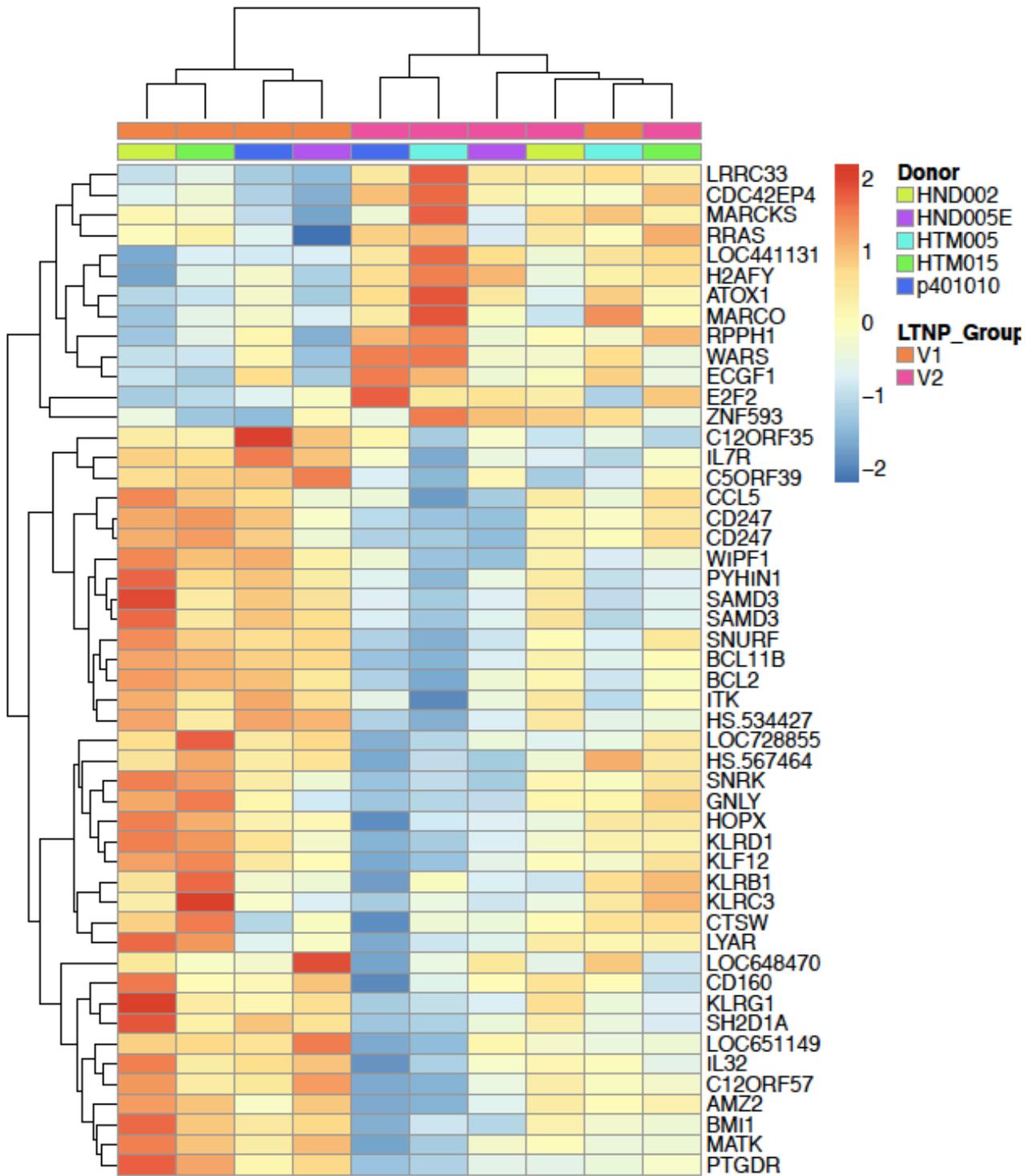
200. Haynes BF, Gilbert PB, McElrath MJ, Zolla-Pazner S, Tomaras GD, Alam SM, et al. 2012. Immune correlates analysis of an HIV-1 vaccine efficacy trial. *N Engl J Med* 366:1275–86.

201. Gomez-Roman VR, Patterson LJ, Venzon D, Liewehr D, Aldrich K, Florese R, et al. 2005. Vaccine elicited antibodies mediate antibody dependent cellular cytotoxicity correlated with significantly reduced acute viremia in rhesus macaques challenged with SIVmac251. *J Immunol* 174:2185–9.
202. Chun TW, Justement JS, Murray D, Kim JC, Blazkova J, Hallahan WC, Benko E, Costiniuk CT, Kandel G, Ostrowski M, Kaul R, Moir S, Casazza PJ, Koup AR, Kovacs C, and Fauci SA. 2013. Effect of Antiretroviral Therapy on HIV Reservoirs in Elite Controllers. *J Inf Dis* 208:1443–7
203. Pereyra F, Palmer S, Miura T, Block BL, Wiegand A, Rothchild AC, Baker B, Rosenberg R, Cutrell E, Seaman SM, Coffin MJ, and Walker DB. 2009. Persistent Low-Level Viremia in HIV-1 Elite Controllers and Relationship to Immunologic Parameters. *J Inf Dis*; 200:984–90.
204. Buchbinder SP KM, Hessol NA, O'Malley PM, Holmberg SD. 1994. Long-term HIV-1 infection without immunologic progression. *AIDS*; 8:1123-8.
205. Cao Y QL, Zhang L, Safrit J, Ho DD. 1996. Characterization of long-term survivors of human immunodeficiency virus type 1 infection. *Immunol Lett*; 51:7-13.
206. Viviana Simon, Nicolin Bloch and Nathaniel R Landau. 2015. Intrinsic host restrictions to HIV-1 and mechanisms of viral escape. *Nat Immunol* 16: 546-53
207. Marcus Altfeld and Michael Gale, Jr. 2015. Innate immunity against HIV-1 infection. *Nat Immunol* 16: 554-62
208. Stephen A Migueles and Mark Connors. 2015. Success and failure of the cellular immune response against HIV-1. *Nat Immunol* 16: 563-70
209. Dennis R Burton and John R Mascola. 2015. Antibody responses to envelope glycoproteins in HIV-1 infection. *Nat Immunol* 16: 571-6
210. Tae-Wook Chun, Susan Moir and Anthony S Fauci. 2015. HIV reservoirs as obstacles and opportunities for an HIV cure. *Nat Immunol* 16: 584-9
211. Gilad Doitsh, Nicole L. K. Galloway, Xin Geng¹, Zhiyuan Yang, Kathryn M. Monroe, Orlando Zepeda, Peter W. Hunt, Hiroyu Hatano, Stefanie Sowinski, Isa Muñoz-Arias and Warner C. Greene. 2014. Cell death by pyroptosis drives CD4 T-cell depletion in HIV-1 infection. *Nat Immunol* 505: 509–514

212. Kang, J.W., Park, Y.S., Kim, M.S., Lee, D.H., Bak, Y., Ham, S.Y., Park, S.H., Hong, J.T., and Yoon, D.Y. 2013. Interleukin (IL)-32beta-mediated CCAAT/enhancer-binding protein alpha (C/EBPalpha) phosphorylation by protein kinase Cdelta (PKCdelta) abrogates the inhibitory effect of C/EBPalpha on IL-10 production. *J Biol Chem* 288:23650-23658.
213. Smyth, G.K. 2005. *Limma: linear models for microarray data*. In "Bioinformatics and Computational Biology Solutions using R and Bioconductor" New York: Springer New York.
214. Subramanian, A., P. Tamayo, V. K. Mootha, S. Mukherjee, B. L. Ebert, M. A. Gillette, A. Paulovich, S. L. Pomeroy, T. R. Golub, E. S. Lander, and J. P. Mesirov. 2005. Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 15545-15550.
215. O'Doherty, U., Swiggard, W.J., and Malim, M.H. 2000. Human immunodeficiency virus type 1 spinoculation enhances infection through virus binding. *J Virol* 74:10074-10080.
216. Mark A. Wallet, Thomas W. Buford, Anna-Maria Joseph, Madhuri Sankuratri, Christiaan Leeuwenburgh, Marco Pahor, Todd Manini, John W. Sleasman and Maureen M. Goodenow. 2015. Increased inflammation but similar physical composition and function in older-aged, HIV-1 infected subjects. *BMC Immunology* 16:43.
217. Audrey Kinter, Andrew Catanzaro, Jo An Monaco, Margaret Ruiz, Jesse Justement, Susan Moir, James Arthos, Alessandra Oliva, Linda Ehler, Stephanie Mizell, Robert Jackson, Mario Ostrowski, James Hoxie, Robin Offord, And Anthony S. Fauci. 1998. CC-chemokines enhance the replication of T-tropic strains of HIV-1 in CD41 T Cells: Role of signal transduction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 11880–11885.
218. Wendy E. Walker, Sebastian Kurscheid, Samit Joshi, Charlie A. Lopez, Gerald Goh, Murim Choi, Lydia Barakat, John Francis, Ann Fisher, Michael Kozal, Heidi Zapata, Albert Shaw, Richard Lifton, Richard E. Sutton, Erol Fikrig. 2015. Increased Levels of Macrophage Inflammatory Proteins Result in Resistance to R5-Tropic HIV-1 in a Subset of Elite Controllers. *J Virol* 89: 5502–5514.

8. ANNEXES

1. Profil d'expression des gènes. Analyse par puces à ADN.



2. Données cliniques des sujets de l'étude.

Tableau I: Liste des progressseurs lents utilisés pour le suivi du taux plasmatique d'IL-32 total (figure 10A).

| ID SUJETS | Compte CD4_visite 1 (cellules/μL) | Charge virale_visite 1 (copies d'ARN/mL) | Compte CD4_visite 2 (cellules/μL) | Charge virale_visite 2 (copies d'ARN/mL) | Nombre de mois entre les visites |
|------------------|---|---|---|---|---|
| 104002 | 820 | 3648 | 490 | 37556 | 60 |
| 104004 | 660 | 18305 | 320 | 14505 | 40 |
| 104008 | 540 | 75934 | 480 | 145566 | 38 |
| 104011 | 430 | 1171 | 270 | 474 | 28 |
| 105008 | 435 | 37948 | 271 | 56100 | 12 |
| 110014 | 450 | 6820 | 240 | 66586 | 18 |
| 102005 | 457 | 3345 | 398 | 14966 | 50 |

Tableau II: Liste des progressseurs lents utilisés pour le suivi du taux cellulaire d'IL-32 total (figures 10B et 10C).

| ID SUJETS | Compte CD4_visite 1 (cellules/μL) | Charge virale_visite 1 (copies d'ARN/mL) | Compte CD4_visite 2 (cellules/μL) | Charge virale_visite 2 (copies d'ARN/mL) | Nombre de mois entre les visites |
|------------------|---|---|---|---|---|
| 104002 | 820 | 3648 | 490 | 37556 | 60 |
| 104004 | 660 | 18305 | 320 | 14505 | 40 |
| 104008 | 540 | 75934 | 480 | 145566 | 38 |
| 104011 | 430 | 1171 | 270 | 474 | 28 |
| 105008 | 435 | 37948 | 271 | 56100 | 12 |
| 106006 | 500 | 41432 | 320 | 41780 | 30 |
| 110014 | 450 | 6820 | 240 | 66586 | 18 |
| 102005 | 457 | 3345 | 398 | 14966 | 50 |

Tableau III: Liste des sujets utilisés pour la comparaison des taux plasmatiques de l'IL-32 alpha (figure 11).

| | ID SUJETS | Compte CD4 (cellules/μL) | Charge virale (copies d'ARN/mL) |
|-------------------------------|------------------|--|--|
| CONTRÔLEURS ÉLITES | 106008 (HDM008) | 810 | 50 |
| | 106017 (HDM017) | 1210 | 47 |
| | 109015 (CQL015) | 730 | 40 |
| | 10922 (CQL022) | 1160 | 40 |
| | 104014 (HND014) | 870 | 40 |
| | 102004 (HTM004) | 868 | 40 |
| | 102006 (HTM006) | 634 | 55 |
| | 110002 (ACT002) | 480 | 50 |
| SUJETS VIRÉMIQUES | HND DRPI075 | 440 | 34864 |
| | HDM 027 | 510 | 75053 |
| | CQL BL003004 | 350 | 10283 |
| | ACT 89215 | 360 | 326709 |
| | ACT 63054 | 350 | 163799 |
| | CQL MAC03010 | 360 | 45692 |
| | HND DRI062 | 380 | 12800 |
| | CQL BL003006 | 500 | 128368 |

Tableau IV: Liste des sujets virémiques et contrôleurs élités utilisés pour la comparaison des taux plasmatiques d'IL-32 total (figure 12A).

| | ID Sujets | Compte CD4 (cellules/μL) | Charge virale (copies d'ARN/mL) |
|--|------------------|--|--|
| SUJETS VIRÉMIQUES | HND DRPI062 | 380 | 12800 |
| | GOL 040G | 357 | 51566 |
| | ACT 63054 | 350 | 163799 |
| | GOL 041G | 281 | 27536 |
| | HND DRPI073 | 400 | 385782 |
| | CQL BL003004 | 350 | 10283 |
| | CQL BL003006 | 500 | 128368 |
| | ACT 89215 | 360 | 326709 |
| | HND DRPI075 | 440 | 34864 |
| | CQL MAC03010 | 360 | 45692 |
| | ACT 118046 | 250 | 84341 |
| SUJETS CONTRÔLEURS ÉLITES | 106008 (HDM008) | 810 | 50 |
| | 106017 (HDM017) | 1210 | 47 |
| | 109001 (CQL001) | 680 | 50 |
| | 109015 (CQL015) | 730 | 40 |
| | 109022 (CQL022) | 1160 | 40 |
| | 104014 (HND014) | 870 | 40 |
| | 102004 (HTM004) | 868 | 40 |
| | 102006 (HTM006) | 634 | 55 |
| | 110013 (ACT013) | 550 | 40 |

Tableau V: Liste des sujets virémiques et contrôleurs élités utilisés pour la comparaison des taux cellulaires d'IL-32 total (figures 12B et 12C).

| | ID SUJETS | Compte CD4 (cellules/μL) | Charge virale (copies d'ARN/mL) |
|--|------------------|--|--|
| SUJETS VIRÉMIQUES | HDM028 | 460 | 85718 |
| | DRPI075 | 440 | 34864 |
| | HTM401 | 242 | 11411 |
| | CQLBL003004 | 350 | 10283 |
| | ACT89215 | 360 | 326709 |
| | ACT63054 | 350 | 163799 |
| | CQLMAC3010 | 360 | 45692 |
| | DRPI062 | 380 | 12800 |
| | CQLBL003006 | 500 | 128368 |
| SUJETS CONTRÔLEURS ÉLITES | HND014 | 870 | 40 |
| | HTM004 | 868 | 40 |
| | ACT002 | 480 | 50 |
| | CQL015 | 730 | 40 |
| | HDM017 | 1210 | 47 |
| | CQL022 | 1160 | 40 |
| | HDM008 | 810 | 50 |
| | HTM006 | 634 | 55 |

Tableau VI: Liste des sujets en primo-infection et un an après la thérapie antirétrovirale (figure 14).

| ID SUJETS | PRIMO-INFECTION | | UN AN ARV | |
|-------------|---------------------------------------|-----------------------------------|---------------------------------------|-----------------------------------|
| | Charge virale (copies d'ARN/mL) | Compte CD4 (cellules/ μ L) | Charge virale (copies d'ARN/mL) | Compte CD4 (cellules/ μ L) |
| HDM 027 | 127175 | 510 | 40 | 580 |
| ACT 101384 | 142517 | 270 | 11130 | 350 |
| ACT 89215 | 5149 | 600 | 40 | 430 |
| HND DRPI072 | 29981000 | 240 | 40 | 670 |
| ACT 88946 | 35303 | 430 | 40 | 690 |
| ACT 55983 | 70 | 1130 | 40 | 970 |
| HDM 028 | 86627 | 580 | 40 | 480 |
| GOL 045G | 6145377 | 380 | 40 | 522 |
| HDM 032 | 40634 | 660 | 40 | 620 |
| HTM 404 | 557083 | 531 | 40 | 793 |

Tableau VII: Liste des sujets utilisés pour les études de corrélations (figures 15, 16, 17 et 18).

| ID SUJETS | Compte CD4_visite 1 (cellules/ μ L) | Charge virale_visite 1 (copies d'ARN/mL) | Compte CD4_visite 2 (cellules/ μ L) | Charge virale_visite 2 (copies d'ARN/mL) | Nombre de mois entre les visites |
|------------------|---|---|---|---|--|
| HTM-001 | 429 | 50 | 125 | 40 | 27 |
| HTM-006 | 723 | 50 | 634 | 55 | 30 |
| HND-014 | 780 | 40 | 750 | 40 | 17 |
| 106008 | 480 | 50 | 370 | 50 | 12 |
| 218001 | 1290 | 50 | 740 | 291 | 27 |
| 109020 | 1280 | 40 | 830 | 714 | 20 |
| HTM-004 | 636 | 50 | 868 | 40 | 60 |
| 105-002 | 658 | 45 | 714 | 60 | 72 |
| 106023 | 690 | 40 | 880 | 48 | 14 |
| 109001 | 680 | 50 | 650 | 40 | 13 |
| 109015 | 670 | 50 | 780 | 40 | 28 |
| EC 218002 | 730 | 50 | 570 | 40 | 32 |
| 218005 | 510 | 40 | 460 | 40 | 25 |
| 401004 | 1130 | 40 | 850 | 40 | 30 |
| 401007 | 990 | 50 | 830 | 39 | 35 |
| 401012 | 950 | 59 | 750 | 40 | 12 |
| 403001 | 950 | 40 | 410 | 39 | 30 |
| 403006 | 980 | 40 | 900 | 40 | 13 |
| 106011 | 870 | 50 | 600 | 50 | 18 |
| 201003 | 365 | 40 | 342 | 40 | 11 |
| 216005 | 670 | 52 | 510 | 40 | 29 |
| 218003 | 320 | 61 | 320 | 40 | 32 |
| 401009 | 580 | 50 | 760 | 835 | 38 |
| 401017 | 490 | 40 | 440 | 40 | 18 |

| ID SUJETS | Compte CD4_visite 1 (cellules/ μ L) | Charge virale_visite 1 (copies d'ARN/mL) | Compte CD4_visite 2 (cellules/ μ L) | Charge virale_visite 2 (copies d'ARN/mL) | Nombre de mois entre les visites |
|--------------|---|---|---|---|---|
| HTM-018 | 670 | 616 | 366 | 1762 | 25 |
| HND-002 | 810 | 2084 | 460 | 53285 | 89 |
| 106001 | 670 | 5654 | 590 | 25170 | 78 |
| 109002 | 780 | 905 | 480 | 3419 | 9 |
| 109006 | 610 | 482 | 510 | 8135 | 90 |
| 110004 | 500 | 194 | 380 | 1426 | 45 |
| 205002 | 700 | 407 | 570 | 9262 | 24 |
| 216009 | 720 | 698 | 530 | 1966 | 26 |
| 216011 | 870 | 49 | 780 | 325 | 35 |
| 217003 | 670 | 707 | 600 | 1212 | 30 |
| 218004 | 970 | 87 | 820 | 152 | 30 |
| 401018 | 650 | 457 | 580 | 999 | 30 |
| 403002 | 480 | 793 | 370 | 7096 | 26 |
| HTM-002 | 549 | 117 | 679 | 3733 | 84 |
| HTM-008 | 535 | 268 | 557 | 284 | 66 |
| HTM-014 | 574 | 744 | 549 | 40 | 59 |
| HTM-016 | 602 | 591 | 850 | 40 | 40 |
| HTM-017 | 486 | 1771 | 537 | 5259 | 46 |
| HND-003 | 720 | 1769 | 990 | 40 | 83 |
| HND-011 | 420 | 1891 | 520 | 40 | 71 |
| HND-013 | 420 | 170 | 630 | 40 | 63 |
| 403004 | 560 | 56 | 510 | 40 | 11 |
| 106003 | 570 | 1198 | 540 | 40 | 85 |
| 106015 | 360 | 658 | 390 | 4320 | 54 |
| 106018 | 650 | 1427 | 760 | 1462 | 6 |
| 205003 | 810 | 301 | 760 | 224 | 21 |
| 208004 | 438 | 8428 | 439 | 1342 | 12 |
| 216001 | 390 | 212 | 400 | 6548 | 24 |
| 216006 | 700 | 1345 | 830 | 4306 | 30 |
| 216008 | 640 | 2420 | 510 | 40 | 35 |
| 216010 | 570 | 78 | 540 | 78 | 29 |
| 217001 | 1190 | 323 | 1230 | 39 | 37 |
| 217002 | 510 | 460 | 580 | 348 | 30 |
| 301001 | 698 | 941 | 646 | 860 | 7 |
| 401008 | 680 | 702 | 760 | 354 | 37 |
| 401015 | 750 | 1090 | 500 | 725 | 30 |
| 401016 | 1160 | 359 | 1390 | 3497 | 24 |
| 403003 | 670 | 232 | 590 | 212 | 25 |

| ID SUJETS | Compte CD4_visite 1 (cellules/ μ L) | Charge virale_visite 1 (copies d'ARN/mL) | Compte CD4_visite 2 (cellules/ μ L) | Charge virale_visite 2 (copies d'ARN/mL) | Nombre de mois entre les visites |
|-----------|---|---|---|---|--|
| HTM-007 | 713 | 3342 | 416 | 5120 | 58 |
| 106006 | 620 | 33218 | 320 | 41780 | 37 |
| 109018 | 740 | 14547 | 530 | 77756 | 17 |
| 109019 | 650 | 16333 | 130 | 78806 | 38 |
| 110011 | 870 | 23140 | 680 | 96952 | 12 |
| 205001 | 590 | 7503 | 580 | 39355 | 36 |
| 109017 | 900 | 14155 | 510 | 26892 | 43 |
| 110001 | 670 | 26746 | 480 | 674 | 26 |
| 208006 | 432 | 49936 | 608 | 121369 | 8 |
| 208007 | 597 | 5454 | 880 | 6507 | 14 |
| HND-008 | 490 | 149122 | 640 | 55 | 83 |
| 106007 | 710 | 36705 | 580 | 21740 | 26 |
| 109007 | 450 | 60576 | 540 | 121490 | 58 |
| 109010 | 690 | 38839 | 310 | 40 | 68 |

| ID SUJETS | Compte CD4_visite 1 (cellules/ μ L) | Charge virale_visite 1 (copies d'ARN/mL) | Compte CD4_visite 2 (cellules/ μ L) | Charge virale_visite 2 (copies d'ARN/mL) | Nombre de mois entre les visites |
|-----------------|---|---|---|---|--|
| 106014 | 370 | 8698 | 320 | 99435 | 43 |
| 110006 | 420 | 4228 | 290 | 42443 | 19 |
| 110007 | 460 | 16973 | 230 | 34075 | 12 |
| GOL102 | 478 | 100891 | 233 | 750375 | 24 |
| CONTRÔLE 109013 | 440 | 2737 | 300 | 5524 | 19 |
| HND-010 | 250 | 703510 | 630 | 51 | 6 |
| 110014 | 530 | 6425 | 580 | 107020 | 18 |
| 106010 | 550 | 50 | 480 | 40 | 76 |
| 106013 | 370 | 70 | 460 | 40 | 29 |

| ID SUJETS | Compte CD4_visite 1 (cellules/μL) | Charge virale_visite 1 (copies d'ARN/mL) | Compte CD4_visite 2 (cellules/μL) | Charge virale_visite 2 (copies d'ARN/mL) | Nombre de mois entre les visites |
|--------------------------|---|---|---|---|---|
| HTM-005 | 401 | 2458 | 294 | 100000 | 89 |
| 105-005 | 518 | 1171 | 437 | 2607 | 29 |
| 208002 | 696 | 89 | 622 | 263 | 27 |
| HND-004 | 630 | 38891 | 590 | 40 | 83 |
| HND-005 | 750 | 27005 | 200 | 50 | 33 |
| HND-016 | 370 | 40 | 510 | 40 | 13 |
| 201005 | 906 | 1420 | 990 | 6639 | 8 |
| EXCEPTIONS 106004 | 860 | 68799 | 1210 | 40 | 95 |
| 208001 | 541 | 15179 | 522 | 15272 | 12 |
| 208008 | 513 | 26970 | 474 | 25962 | 6 |
| 216004 | 300 | 936 | 360 | 1956 | 13 |
| 401002 | 450 | 310 | 340 | 1969 | 35 |
| 401011 | 390 | 55 | 330 | 284 | 24 |
| 401013 | 240 | 40 | 150 | 40 | 19 |
| 101-001 | 830 | 40 | 810 | 51 | 6 |

Tableau VIII: Liste des sujets utilisés pour la corrélation IL32 total et CCL5 (figure 19).

| ID SUJETS | Compte CD4_visite 1 (cellules/μL) | Charge virale_visite 1 (copies d'ARN/mL) | Compte CD4_visite 2 (cellules/μL) | Charge virale_visite 2 (copies d'ARN/mL) | Nombre de mois entre les visites |
|------------------|---|---|---|---|---|
| 104002 | 820 | 3648 | 490 | 37556 | 60 |
| 104004 | 660 | 18305 | 320 | 14505 | 40 |
| 104008 | 540 | 75934 | 480 | 145566 | 38 |
| 104011 | 430 | 1171 | 270 | 474 | 28 |
| 105008 | 435 | 37948 | 271 | 56100 | 12 |
| 106004 | 660 | 43701 | 370 | 73066 | 48 |
| 106006 | 500 | 41432 | 320 | 41780 | 30 |
| 110014 | 450 | 6820 | 240 | 66586 | 18 |
| 102005 | 457 | 3345 | 398 | 14966 | 50 |
| 401010 | 800 | 7206 | 720 | 122530 | 24 |

3. Liste des présentations

01/11/2013. Journée SIDA et Maladies Infectieuses du Fonds de Recherche en Santé du Québec (FRSQ), «Essai ex-vivo pour évaluer l'activité suppressive des cellules T-CD8 régulatrices spécifiques au VIH-1», Hôtel Méridien, Montréal, Qc, Canada. *Présentation orale.*

RÉSUMÉ:

Introduction. Dans le cadre des recherches concourant à la mise au point d'un vaccin contre l'infection à VIH, il s'avère très intéressant d'évaluer l'activité suppressive des lymphocytes TCD8 spécifiques au VIH de type 1. C'est dans cette optique, que nous nous sommes proposé de tester chez les sujets infectés par le VIH-1, élités contrôleurs l'activité suppressive ex vivo des lymphocytes TCD8 spécifiques au VIH-1 sur des lymphocytes TCD4 hétérologues infectés.

Méthodes. Nous n'avons pas encore de résultats préliminaires. Néanmoins, nous vous présenterons les approches expérimentales utilisées pour cet essai.

Les cellules TCD4 sont isolées à partir de PBMC de donneurs non infectés par le VIH afin de minimiser les variations possibles entre donneurs VIH positifs.

Ces cellules CD4 sont ensuite infectées par du virus VIH-1 de sous-type B ou non B à 10^{-2} MOI. Les cellules TCD8 sont isolées de PBMC provenant uniquement de sang fraîchement prélevé de patients VIH-1 positifs élités contrôleurs. Les cellules TCD4 et TCD8 sont mises en coculture en comparaison avec les cellules TCD4 mises en culture sans cellules TCD8. L'activité suppressive des cellules TCD8 est évaluée dans les surnageants de culture cinq jours après l'infection par la technique ELISA p24 ou préférentiellement par RT-PCR.

Conclusion. A l'issus de cet essai, nous nous attendons à observer une absence ou une très faible répllication virale dans les puits de coculture CD4-CD8. Les résultats de cette expérience pourront servir à l'avancée des recherches concernant les stratégies thérapeutiques et préventives contre l'infection à VIH.

05/12/2013. 16e congrès annuel des étudiants du CRCHUM, «Essai ex-vivo pour évaluer l'activité suppressive des cellules T-CD8 régulatrices spécifiques au VIH-1», CRCHUM, Département de médecine, Université de Montréal, QC, Canada. *Présentation par affiche.*

RÉSUMÉ:

Pascale Kouassi*, Sandrina Da Fonseca, Mohamed Sylla, Annie Chamberland, Annie Gosselin, Petronela Ancuta et Cécile Tremblay.

Introduction. Dans le cadre des recherches concourant à la mise au point d'un vaccin contre l'infection à VIH, il s'avère très intéressant d'évaluer l'activité suppressive des lymphocytes T CD8⁺ spécifiques au VIH-1. C'est dans cette optique, que nous nous sommes proposé de tester chez les sujets élités contrôleurs l'activité suppressive *ex vivo* des lymphocytes T CD8⁺ spécifiques au VIH-1 sur des lymphocytes T CD4⁺ hétérologues infectés in vitro.

Méthodes. Les cellules T CD4⁺ sont isolées à partir de PBMC de donneurs non infectés par le VIH par sélection positive en utilisant des billes magnétiques. Les cellules T CD4⁺ sont ensuite infectées in vitro par une souche VIH-1 primaire à 10⁻² MOI. Les cellules T CD8⁺ sont isolées de PBMC provenant du sang fraîchement prélevé de patients élités contrôleurs. Les cellules T CD4⁺ et T CD8⁺ sont mises en coculture en comparaison avec les cellules T CD4⁺ mises en culture sans cellules T CD8⁺. L'activité suppressive des cellules T CD8⁺ est évaluée par mesure de la présence de virions dans les surnageants de culture cinq jours après l'infection par la technique ELISA p24 et par RT-PCR.

Résultats préliminaires. Après analyse des surnageants de culture par la technique ELISA p24, on observe une de la réplication virale accrue dans les puits de culture contenant seulement des cellules T CD4⁺ contrairement à une inhibition presque totale de la réplication virale dans les puits de coculture CD4-CD8.

Conclusion. Ces résultats préliminaires de cet essai suggèrent que les cellules T CD8⁺ de sujets élités contrôleurs sont capables d'inhiber la réplication virale dans des cellules T CD4⁺ hétérologues infectées in vitro. Des expériences futures visent l'inclusion de sujets supplémentaires dans cette étude et aussi la compréhension des mécanismes moléculaires par lesquelles les cellules T CD8⁺ contrôlent la réplication virale. Ces résultats pourront servir à l'avancée des recherches concernant les stratégies thérapeutiques et préventives contre l'infection à VIH.

05/12/2014. 17e congrès annuel des étudiants du CRCHUM, «**Évaluation du rôle de l'interleukine-32 dans la progression de l'infection par le VIH-1**», CRCHUM, Département de médecine, Université de Montréal, QC, Canada. *Présentation par affiche.*

RÉSUMÉ:

Pascale Kouassi*, Mohamed Sylla, Annie Chamberland, Yuwei Zhang, Petronela Ancuta, Mohamed El-Far et Cécile Tremblay.

CRCHUM, Département de médecine, Université de Montréal, QC, Canada.

Introduction. L'interleukine-32 (IL-32) est connue comme une cytokine pro-inflammatoire impliquée dans plusieurs pathologies. Nous nous sommes intéressés à étudier le rôle de l'IL-32 dans la progression de l'infection par le VIH-1 chez les sujets virémiques et les élites contrôleurs. Ces derniers ont la capacité de maintenir la virémie à un niveau indétectable (<50 copies ARN viral/mL) sans thérapie antirétrovirale pour >7 années tout en demeurant asymptomatiques.

Méthodes. Les PBMC provenant de sujets VIH positif virémiques, EC et VIH négatif ont été activées par PHA et IL-2. À jour 1, le surnageant et le culot cellulaire ont été prélevés. Les culots cellulaires ont été lysés et les protéines totales quantifiées par la méthode de Bradford. L'IL-32 a été dosée par ELISA sur les lysats de PBMC. Pour ces mêmes sujets, l'IL-32 a été dosée dans le plasma. Également, nous avons dosé le taux d'IL-32 chez les sujets EC avant et après la perte de contrôle.

Résultats préliminaires. Le taux d'IL-32 était plus élevé chez les sujets virémiques et EC contrairement aux sujets VIH négatif. Cependant, ce taux a été supérieur chez les sujets virémiques comparativement aux sujets EC. Comme attendu, le taux d'IL-32 augmente chez un sous groupe des sujets EC qui subissent une perte du contrôle de la virémie et corrèle positivement avec des facteurs pro-inflammatoires telle que le sCD14.

Conclusions. Ces résultats suggèrent que l'IL-32 est beaucoup plus sécrétée en faveur d'un processus pro-inflammatoire. L'IL-32 pourrait constituer une cible thérapeutique afin de réduire le processus inflammatoire chronique chez les sujets VIH positif pour réduire l'épuisement immunitaire.