

UNIVERSITÉ DE NANTES
FACULTÉ DES SCIENCES ET DES TECHNIQUES

ÉCOLE DOCTORALE BIOLOGIE-SANTÉ

Année 2010

**Réponse immune cellulaire
et thérapie de l'infection par le VIH.**

THESE DE DOCTORAT

Discipline: Science de la vie

Spécialité: Immunovirologie

Présentée et soutenue publiquement par

Yovana PACHECO NIEVA

Le 11 Octobre 2010, devant le jury ci-dessous

Rapporteurs : APPAY Victor, CR/ HDR, Paris

DESCAMPS Diane, PU-PH, Paris

Examineurs : CHAKRABARTI Lisa, CR/ HDR, Paris

GERVOIS Nadine, PU, Nantes

Directeurs de thèse

FERRE Virginie, PU-PH, Nantes

MCILROY Dorian, MC/HDR, Nantes

Table des matières

I.	INTRODUCTION	9
II.	RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES	12
A.	Histoire de la découverte du VIH	13
B.	Épidémiologie du VIH	15
C.	VIH-Généralités	17
1.	Structure	17
2.	Organisation génétique des VIH-1	18
3.	Cycle de réplication virale dans la cellule hôte.	24
4.	Histoire Naturelle du VIH	32
D.	Réponse Immune de l'hôte contre le VIH	36
1.	Réponse humorale spécifique	36
2.	Réponses cellulaires spécifiques	37
E.	Prise en charge thérapeutique du patient infecté	41
1.	Les molécules antirétrovirales disponibles	41
2.	Recommandations de prise en charge des personnes infectées par le VIH en 2010.	43
F.	Échecs thérapeutiques	48
1.	Échec Virologique et résistance aux antirétroviraux	48
2.	Échec Immunologique.	56
III.	REPONSE CYTOTOXIQUE CONTRE L'ÉPITOPE 181-189 DE LA TRANSCRIPTASE INVERSE (RT) DU VIH CHEZ DES PATIENTS EN ECHEC VIROLOGIQUE SOUS 3TC	66
A.	Objectifs	67
B.	Matériel et Méthodes	69
1.	Patients et Prélèvements	69
2.	Phénotypage HLA-A2 ⁺ sur sang total	70
3.	Phénotype des lymphocytes CD8 ⁺ et CD4 ⁺ sur cellules décongelées.	70
4.	Analyse des résultats de cytométrie en flux.	71
5.	Quantification de la réponse CTL par ELISpot IFN- γ .	71
6.	Clonage et Lignée CTL	74
7.	Avidité Fonctionnelle.	75
8.	Séquençage de la RT (VIH-1)	75
9.	Tests statistiques	76
C.	Résultats	77
1.	Comparaison des caractéristiques virologiques et immunologiques des patients .	77
2.	Réponses IFN- γ à la stimulation par différents peptides : Comparaison Groupe 3TC/N	81
3.	La mutation M184V : Une mutation d'échappement aux CTL ?	85
4.	Réponse ELISpot spécifiquement dirigée contre YV9V dans le groupe 3TC	89
5.	Modèle d'évolution de la réponse CTL contre YV9 au cours de l'infection	90
6.	Vérification du modèle établi: Études longitudinales.	92
7.	Rôle de la séquence virale environnante.	94
8.	Analyse Multivariée	95
9.	Réponse YV9 asymétrique?	97
D.	Discussion	103
1.	Identification de l'épitope le plus fréquemment reconnu.	103
2.	Facteurs impliqués dans la génération d'une réponse spécifique contre YV9	104
3.	Reconnaissance de l'épitope par le TCR.	106

Table des matières

E. Conclusion et perspectives	108
IV. EFFET DE L'IL-15 ET DE SON SUPER-AGONISTE (RLI) SUR LA PROLIFERATION DES LYMPHOCYTES T CHEZ DES PATIENTS VIH⁺ COMPARAISON AVEC L'IL-2 ET L'IL-7	109
A. Objectif	110
B. Patients et Méthodes	112
1. Patients	112
2. Préparation des PBMC	112
3. Culture cellulaire et stimulation par les cytokines	113
4. Purification des lymphocytes T	113
5. Analyse de l'apoptose	114
6. Analyse de la prolifération	114
7. Marquage de la chaîne α du récepteur à l'IL-7 (CD127)	115
8. Analyse en cytométrie en flux	115
9. Analyse Statistique.	116
C. Résultats	117
1. Effet anti-apoptotique des cytokines	117
2. Effet prolifératif des cytokines	120
3. Comparaison de l'efficacité IL-15/RLI	124
4. Prolifération au sein des sous-populations T CD4 ⁺	129
5. Expression de la chaîne α du récepteur à l'IL-7, le CD127	136
D. Discussion	141
1. Comparaison IL15/ RLI	141
2. Réponse fonctionnelle à l'IL7 et expression de la chaîne α de IL7R	142
3. IL-15 et RLI : Candidats pour une thérapie de l'infection par le VIH ?	144
E. Conclusions et perspectives	146
V. CONCLUSION	147
VI. BIBLIOGRAPHIE	149
VII. ANNEXES	177

Liste des figures

Figure 1 : Évolution de la pandémie mondiale de l'infection par le VIH dans le monde en 2009.....	15
Figure 2: Structure du VIH	17
Figure 3: Génome, transcrits et protéines du VIH	18
Figure 4: Cycle réplcatif du VIH.....	24
Figure 5: Mécanisme d'entrée du VIH dans la cellule.....	25
Figure 6: Structure du précurseur protéique Pr55 ^{gag}	29
Figure 7: Schéma de l'assemblage, le bourgeonnement et la maturation du VIH.	30
Figure 8: Histoire Naturelle du VIH.....	32
Figure 9: Réponse immunologique humorale et cellulaire au cours de l'histoire naturelle du VIH.	36
Figure 10: Charge virale et identification des virus mutés chez des patients traités par monothérapie de Lamivudine (3TC).	53
Figure 11: Cercle vicieux établie durant la primo-infection du VIH dans la muqueuse gastro-intestinale	57
Figure 12: Relation entre le taux de CD4 des patients au moment de l'initiation du ART et les événements SIDA ou le décès.	58
Figure 13: Interleukines de la famille de la chaîne γ commune et leurs récepteurs	59
Figure 14: La transprésentation de l'IL-15.....	63
Figure 15: Exemple d'un résultat de révélation d'une plaque ELISpot.....	74
Figure 16: Comparaison de l'expression des marqueurs des lymphocytes CD8 ⁺ au sein des deux groupes N et 3TC	80
Figure 17: Réponse IFN- γ mesurée par ELISpot des patients 3TC et N contre les épitopes de références IV9 (RT) et SL9 (Gag) restreints HLA-A2 ⁺	82
Figure 18 : Séquence en acides aminés de la région de la RT contenant les épitopes VL9 et YV9	83
Figure 19: Réponse IFN- γ mesurée par ELISpot des PBMC des patients N et 3TC contre les épitopes YV9 M et YV9 V restreints par HLA-A2 ⁺	84
Figure 20: Réponse IFN- γ mesurée par ELISpot contre YV9M et YV9V parmi les patients du groupe N	86
Figure 21: Corrélation entre l'intensité de la réponse ELISpot contre YV9M et autres épitopes de la transcriptase inverse.	87
Figure 22: Avidité fonctionnelle du Clone 8D10 contre YV9M et YV9V	88
Figure 23: Réponse IFN- γ mesurée par ELISpot contre YV9V et YV9M au sein du groupe 3TC.	89
Figure 24: Évolution de la charge virale des patients en échec virologique	90
Figure 25: Modèle d'évolution de la réponse CTL contre YV9 au cours de l'infection	91
Figure 26: Comparaison de la réponse IFN- γ contre les épitopes YV9M et YV9V avant et après l'initiation du traitement	93
Figure 27: Proportions de réponses YV9 des patients porteur d'un virus 177E ou 177D/N de la RT....	94
Figure 28: Modèle du contact TCR-acide aminé en position 4 de l'épitope YV9 (méthionine ou valine).....	97
Figure 29: Réponse IFN- γ mesurée par ELISpot des clones spécifiques de YV9M ou YV9V	99
Figure 30: Avidités fonctionnelles du clone 8D10 et des lignées CTL, contre sept variantes de YV9 ayant un acide aminé différent en position 4.	100
Figure 31: Structure du super agoniste de l'IL-15 (RLI).....	110
Figure 32: Mesure de l'apoptose spontanée par marquage à l'Annexine-V et analyse par cytométrie en flux.....	117
Figure 33: Effet anti-apoptotique d'IL-2, IL-7, IL-15 et RLI sur les cellules T CD8 ⁺	118
Figure 34: Effet anti-apoptotique d'IL-2, IL-7, IL-15 et RLI sur les cellules T CD4 ⁺	119
Figure 35: Mesure de la prolifération cellulaire par marquage par du CFSE et analyse par cytométrie en Flux	121
Figure 36: Effet prolifératif d'IL-2, IL-7, IL-15 et RLI sur les cellules T CD8 ⁺	122
Figure 37: Effet prolifératif d'IL-2, IL-7, IL-15 et RLI sur les cellules T CD4 ⁺	123
Figure 38: Réponse proliférative de la lignée 32D β au RLI et à l'IL-15	125
Figure 39 : Réponse proliférative des lymphocytes CD8 ⁺ en fonction de la dose du RLI ou d'IL-15.	126
Figure 40 : Réponse proliférative des lymphocytes CD4 ⁺ en fonction de la dose du RLI ou de l'IL-15 ..	126
Figure 41: Marquage CD3 des PBMC avant et après tri magnétique des lymphocytes T	127

Liste des figures

<i>Figure 42 : Réponse proliférative à IL-7, IL-15 et RLI des cellules CD8⁺ et CD4⁺</i>	<i>128</i>
<i>Figure 43: Analyse de la prolifération cellulaire induite par l'IL-2, IL-7, IL-15 et RLI au sein des sous-populations CD4⁺</i>	<i>130</i>
<i>Figure 44: Effet prolifératif de l'IL-2, IL-7, IL-15 et RLI sur les cellules T CD4⁺ Naïfs.....</i>	<i>132</i>
<i>Figure 45: Effet prolifératif de l'IL-2, IL-7, IL-15 et RLI sur la sous-population T CD4⁺ mémoire effectrice</i>	<i>134</i>
<i>Figure 46: Effet prolifératif d'IL-2, IL-7, IL-15 et RLI sur la sous-population T CD4⁺ mémoire centrale</i>	<i>135</i>
<i>Figure 47: Stratégie d'analyse du niveau d'expression de la molécule CD127</i>	<i>137</i>
<i>Figure 48: Expression de CD127 par les lymphocytes CD4⁺ totaux.....</i>	<i>138</i>
<i>Figure 49: Expression de CD127 au sein des sous-populations des lymphocytes CD4⁺</i>	<i>138</i>
<i>Figure 50 : Corrélations entre la valeur absolue de lymphocytes T CD4⁺ et l'expression de CD127</i>	<i>140</i>

Liste des tableaux

<i>Tableau I : Molécules antirétrovirales disponibles en 2010.....</i>	<i>45</i>
<i>Tableau II: Recommandations 2010 pour la première ligne de traitement en France</i>	<i>46</i>
<i>Tableau III: Anticorps utilisés pour le marquage des lymphocytes.</i>	<i>70</i>
<i>Tableau IV: Peptides utilisés dans la technique d'ELISpot.....</i>	<i>72</i>
<i>Tableau V: Comparaison des caractéristiques immunobiologiques entre le groupe de patients naïfs de traitement (N) et le groupe en échec virologique sous 3TC (3TC)</i>	<i>77</i>
<i>Tableau VI: Séquences de la RT virale entre les acides aminés 171 et 199.....</i>	<i>78</i>
<i>Tableau VII : Tables de Fisher comparant la fréquence des réponses ELISpot détectées entre les deux groupes Naïf et 3TC.</i>	<i>81</i>
<i>Tableau VIII: Tables de Fisher comparant la fréquence des réponses ELISpot détectées entre les deux groupes Naïf et 3TC.</i>	<i>84</i>
<i>Tableau IX: Séquence TCR du clone 8D10</i>	<i>88</i>
<i>Tableau X: Résultats des analyses multivariées successives évaluant les variables impliquées dans la génération d'une réponse contre YV9</i>	<i>96</i>
<i>Tableau XI : Probabilité d'obtenir une réponse contre YV9 en fonction de l'acide aminé en position 177 et la charge virale.</i>	<i>105</i>
<i>Tableau XII: Résultats du post-test comparant deux à deux les effets des cytokines sur les Lymphocytes T CD4⁺naïfs</i>	<i>132</i>
<i>Tableau XIII: Résultats du Post test comparant deux à deux les effets des molécules sur les lymphocytes T CD4⁺_{EM}.....</i>	<i>134</i>
<i>Tableau XIV: Résultats du post test comparant deux à deux les effets des molécules sur les lymphocytes T CD4⁺_{CM}.....</i>	<i>135</i>

Liste des abbréviations

3TC:	Lamivudine
ADN:	acide désoxyribonucléique
Ag:	antigène
AMM :	autorisation de mise sur le marché
APC:	cellule présentatrice d'antigène
APOBEC3G:	apolipoprotein B mRNA-editing enzyme catalytic polypeptide-like 3G
ARN:	acide ribonucléique
ARNm :	acide ribonucléique messenger
ART:	traitement antirétroviral
ARV:	AIDS-related virus
CA:	capside
CFSE:	carboxyl fluroscein diacetate succinidyl ester
CM:	mémoire centrale
CMH:	complexe majeur d'histocompatibilité
CMV:	cytomégalovirus
CRFs:	formes circulantes recombinantes
CTL:	lymphocytes T cytotoxiques
CV:	charge virale
DIS:	dimerisation initiation site
ELISpot:	enzyme-linked immunosorbent spot
EM:	effecteur mémoire
Env:	enveloppe
ESCRTT:	endosomal sorting complex required for transport
FTC:	Emictrabine
FSC	forward scatter
gag:	group-specific antigen
GALT:	gut-associated lymphoid tissue
gp:	glycoprotéine
HLA:	human leukocyte antigen
HTLV-3:	human T-lymphotropic virus Type 3

Liste des abréviations

I.C:	intervalle de confiance
IF:	inhibiteur de fusion
IFN:	interféron
IgG:	immunoglobuline
IL:	interleukine
IL15R:	récepteur à l'IL-15
IL7R:	récepteur à l'IL-7
INNTI:	inhibiteur non nucléosidique de la transférase inverse
Int:	intégrase
INTI:	inhibiteur nucléosidique de la transférase inverse
IP:	Inhibiteur de protéase
LAV:	lymphadenopathy associated virus
LPS:	lipopolysaccharide
LT:	lymphocytes T
LTNP :	non progresseur à long terme
LTR:	long terminal repeat
MPER:	membrane proximal external region
N.S:	non significatif
N:	naïf
NC:	nucléocapside
Nef:	facteur de régulation négative
NES:	nuclear export signal
NK:	natural killer
NLS	nuclear localisation signal
OMS:	organisation mondiale de la santé
PBMC:	peripheral blood mononuclear cell
PHA:	phytohémagglutinine
PIC:	complexe de pré-intégration
Prot:	protéase virale
Rev :	régulateur d'expression du virion
RRE :	Rev responsive element
RT:	transcriptase inverse

Liste des abbréviations

SD :	donor site
SFC:	cellules formant un spot
SIDA:	syndrome de l'immunodéficience acquise
SIV :	virus de l'immunodéficience chez le singe
SSC	side scatter
SVF	sérum de vœu foetal
SU:	glycoprotéine de surface
T ⁻ :	témoin négatif
TAM:	thymidine analogue mutation
Tat:	transactivator of transcription
TCR:	récepteur des cellules T.
TM:	glycoprotéine transmembranaire
TNF:	facteur de nécrose tumorale
Treg:	lymphocyte T régulateur
VHB:	virus de l'hépatite B
VHC:	virus de l'hépatite C
Vif:	virus infectivity factor
VIH :	virus de l'immunodéficience humaine
VIH ⁻ :	séronégatif pour le VIH
VIH ⁺ :	séropositif pour le VIH
Vpr:	protéine virale R
Vpu:	protéine virale U

I. Introduction

Le syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA) a tué plus de 25 millions de personnes depuis qu'il a été identifié en 1982, ce qui en fait l'une des épidémies les plus dévastatrices de l'histoire. (Rapport OMS 2007)

Durant les 28 dernières années, la recherche immunologique et virologique ont accompli des avancées spectaculaires, non seulement en termes de thérapeutique mais aussi en termes de compréhension de la pathogénèse du virus.

Le succès le plus important a été le développement d'un traitement contre l'infection par le VIH, constitué par une association de plusieurs molécules anti-rétrovirales qui parviennent à bloquer la réplication virale, entraînant une baisse de la charge virale plasmatique et une restauration au moins partielle de la population des lymphocytes TCD4⁺ atteinte par le virus.

Même si cette réussite est évidente, la trithérapie reste un moyen de contenir le virus mais non pas de l'éradiquer. Les patients traités sont contraints de suivre le traitement pendant le restant de leur vie. L'efficacité de ce traitement peut être ternie par deux difficultés majeures : D'une part l'émergence de souches résistantes aux médicaments, ce qui peut conduire à un échec virologique ; Et d'autre part la reconstitution immunologique incomplète qui peut rendre certains patients traités susceptibles à la survenue de cancers ou d'infections opportunistes.

L'équipe d'immunovirologie et polymorphisme génétique de Nantes, EA 4271, travaille à la fois sur la diversité génétique virale et sur l'interaction immunologique hôte-pathogène. Des projets de recherche reliant la réponse immunitaire et la variabilité génétique des virus y sont développés.

Ainsi, le cadre général de mon travail de thèse a été d'évaluer deux approches immunologiques différentes visant à lutter contre les échecs thérapeutiques les plus fréquents en pathologie VIH.

Tout d'abord nous avons abordé le lien entre mutation de résistance et développement de la réponse immune spécifique. En effet, plusieurs mutations de résistance, à l'origine de l'échec virologique sont localisées au sein des épitopes reconnus par les lymphocytes cytotoxiques (CTL), suggérant que la réponse CTL est également capable d'exercer une pression de sélection contre les virus résistants aux médicaments. L'objectif du premier projet de thèse a été de comparer la fréquence et l'importance de la réponse cytotoxique

dirigée contre l'épitope RT 181-189 chez un groupe de patients non-traités et un groupe de patients en échec thérapeutique HLA-A2⁺ séropositifs pour le VIH.

Par ailleurs, en 2007 plusieurs essais cliniques avaient montré une amélioration de la restauration du compartiment TCD4⁺ en utilisant des cytokines de la famille de la chaîne γ commune, notamment l'IL-2. Ces résultats encourageants suggèrent que d'autres cytokines de la famille, comme l'IL-7 ou l'IL-15, pourraient être exploitées dans le traitement de l'infection par le VIH dans le but de restaurer l'immunocompétence. L'objectif de mon deuxième projet a été d'étudier l'activité de la cytokine IL-15 ainsi que de son super-agoniste le RLI, sur les lymphocytes T circulants des patients séropositifs pour le VIH, afin d'évaluer *in vitro* leurs potentiels en tant que nouveaux agents immunothérapeutiques contre le VIH.

Ces deux projets ont pu être menés à bien grâce à la collaboration existante entre le service clinique de l'Hôtel Dieu de Nantes qui assure le recrutement des patients et l'équipe de recherche. Les études portent sur des patients séropositifs pour le VIH participant à la cohorte PLACEVIH. Un consentement éclairé autorisant l'utilisation des prélèvements pour la recherche est signé par chaque patient inclus. Le suivi médical ainsi que les données cliniques sont archivées grâce au logiciel NADIS.

La première partie de ce document expose de manière concise les connaissances actuelles de la biologie, l'histoire naturelle, la réponse immune et la prise en charge thérapeutique de l'infection par le VIH nécessaires pour introduire nos travaux. La partie expérimentale est ensuite abordée et divisée en deux parties:

-Le projet sur la réponse cytotoxique contre un épitope de la RT contenant une mutation de résistance.

-L'analyse des effets prolifératifs de l'IL-7, l'IL-15 et son agoniste, le RLI sur les PBMC des patients VIH⁺

Chaque partie sera discutée individuellement pour finir par une conclusion générale

II. Rappels Bibliographiques

A. Histoire de la découverte du VIH

En 1981, les premiers cas de SIDA (Syndrome de l'immunodéficience acquise) ont été décrits aux États-Unis chez des patients présentant un effondrement du nombre de lymphocytes T CD4⁺ circulants. Différents virus, bactéries et parasites, habituellement peu infectieux, provoquaient alors des maladies graves (pneumocystose pulmonaire, sarcome de Kaposi). Ce syndrome fut observé chez des patients homosexuels, puis chez des patients hémophiles transfusés aux débuts des années 80 (Mildvan et al., 1982) (Update on acquired immune deficiency syndrome (AIDS)--United States, 1982). Le mode de transmission par voie sexuelle et voie sanguine a permis, à la fin de l'année 1982, d'émettre l'hypothèse d'une origine virale de l'agent infectieux (Quagliarello, 1982).

Le nouveau syndrome n'ayant pas pu être assimilé à un autre virus déjà connu, l'équipe du Pr. Montagnier au sein de l'Institut Pasteur s'est orientée vers de nouvelles pistes, notamment celle des rétrovirus. En effet, un rétrovirus observé chez le chat était responsable d'une immunodéficience similaire à celle décrite chez l'homme (Hardy et al., 1969). En 1983, une activité reverse transcriptase caractéristique des rétrovirus a été mise en évidence dans le surnageant d'une culture cellulaire issue d'une biopsie ganglionnaire d'un patient en stade-pré-SIDA (Barré-Sinoussi et al., 1983); à ce moment, le virus fut appelé *Lymphadenopathy Associated Virus* (LAV). Fin 1983, l'équipe de Robert Gallo (National Institute of health des Etats-Unis) publie dans *Science*, les résultats de l'isolement d'un virus qu'elle considère alors comme l'agent responsable du Sida et le nomme HTLV-3 (Gallo et al., 1983). De même, l'équipe de Jay A. Levy travaillant à St Francisco, identifie un rétrovirus possiblement associé au SIDA, nommé ARV (*AIDS-related virus*) (Levy et al., 1984). A cette époque, le lien entre les virus identifiés et le SIDA n'est pas encore formellement établi.

De 1983 à 1985, malgré la controverse existant entre les trois virus isolés, les recherches sur le LAV se poursuivent. À la fin de l'année 1985, la caractérisation, le séquençage et le lien de causalité LAV-maladie sont établis (Wain-Hobson et al., 1985). Les premiers tests de diagnostic sérologique détectant les anticorps dirigés contre le virus sont mis au point par les laboratoires Abbott, Pasteur et Organon-Teknika; ils ne seront commercialisés qu'à la fin de l'année 1985.

En 1985, l'identité commune des trois virus LAV, HTLV-3 et ARV est confirmée et le terme de

VIH (virus de l'immunodéficience humaine) remplace ces trois appellations, mais la controverse sur la paternité de la découverte du VIH se prolonge pendant plusieurs années. Le 4 décembre 1987, lors d'une rencontre entre le président américain Ronald Reagan et le premier ministre français de l'époque Jacques Chirac, un accord est signé, et la paternité de la découverte est attribuée à parts égales entre les États-Unis et la France. Les redevances associées aux tests diagnostiques du VIH sont partagées entre les instituts américains alors qu'en Europe, elles reviennent intégralement à l'Institut Pasteur.

La paternité de la découverte est définitivement attribuée aux travaux français et particulièrement à l'Institut Pasteur, par la remise en 2008 du Prix Nobel de médecine à Françoise Barré-Sinoussi et Luc Montagnier.

Grâce au séquençage du VIH, l'équipe de l'Institut Pasteur est capable d'identifier, en 1986, un nouveau type de virus issu du sang d'un patient venant de l'Afrique de l'Ouest (Clavel et al., 1986). Ce nouveau virus est appelé alors VIH-2, le premier virus séquencé est désormais appelé le VIH-1. Les deux séquences des virus diffèrent : le VIH-1 possède une séquence proche de celle du SIV isolé chez les chimpanzés alors que le VIH-2 se rapproche plus du SIV isolé chez les mangabéys. En comparaison avec le VIH-1, le VIH-2 est moins pathogène induisant une plus faible diminution du taux des lymphocytes T CD4⁺ et une période plus longue d'infection asymptomatique (Gottlieb et al., 2002)

B. Épidémiologie du VIH

Les modes de transmission du virus, par les liquides biologiques, sang, sécrétions génitales et lait maternel, expliquent l'épidémiologie. L'infection a d'abord été décrite dans les pays développés chez des homosexuels à partenaires multiples, des usagers de drogues intraveineuses partageant leurs seringues, des hémophiles transfusés, puis chez leurs partenaires. Actuellement la transmission hétérosexuelle du VIH est à l'origine de la très grande majorité des cas mondiaux. Cependant, l'épidémiologie de l'infection est très variable en fonction des pays. Dans les pays en voie de développement, l'Afrique, l'Amérique du Sud, et l'Asie, la transmission du virus est très majoritairement hétérosexuelle; tandis que dans les pays développés, les groupes les plus sensibles sont les homosexuels masculins et les hétérosexuels. Les usagers de drogues intraveineuses sont moins atteints en 2010 dans les pays développés grâce au programme de prévention (distribution de seringues nouvelles) alors que cette épidémie explose dans les pays de l'Est européen, la Chine et les pays du sud par rejet de cette population.

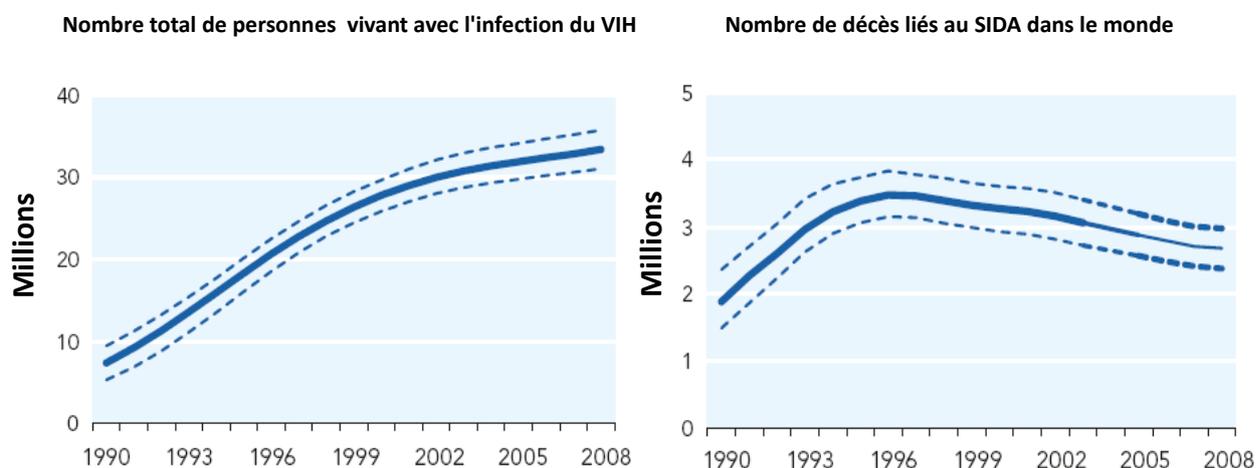


Figure 1 : Évolution de la pandémie mondiale de l'infection par le VIH dans le monde en 2009

(Source UNAIDS/WHO)

En 1995, l'OMS estimait à 20 millions le nombre des personnes vivant avec l'infection VIH dans le monde (figure 1). Après une forte croissance liée aux nouveaux cas détectés, le nombre des personnes infectées a tendance à se stabiliser à partir de l'année 2000. Malgré cette stabilisation de l'épidémie, le taux de personnes infectées par le VIH reste très élevé.

En 2008, on estimait à 33,4 millions le nombre total de personnes vivant avec l'infection VIH

dans le monde, à 2,7 millions le nombre de nouvelles contaminations ainsi qu'à 2 millions le nombre de morts liées au SIDA annuellement.

La région la plus touchée par l'épidémie du VIH reste l'Afrique subsaharienne; en 2008, elle représente 71% de la totalité des personnes vivant avec le VIH et 67% de décès liés au SIDA, mais l'épidémie n'épargne aucune région du monde. D'après le rapport épidémique de 2009 d'UNAIDS, le SIDA reste un problème de santé mondiale, représentant encore une des premières causes de mortalité dans le monde. De plus, comme le nombre de personnes vivant avec l'infection du VIH augmente, les projections montrent que dans les décennies à venir le SIDA continuera d'être une cause considérable de mortalité prématurée. (Global Report UNAIDS/WHO 2009)

Le virus responsable de l'épidémie globale est le VIH-1; il est représenté sous trois grands groupes génétiques distribués dans le monde entier: Le groupe M (Main pour Majeur en anglais), le groupe O (Outlier pour aberrant en anglais) et le groupe N (Non-M et Non-O). Très récemment, un nouveau type d'isolat VIH a été détecté chez une femme camerounaise ne présentant aucune évidence de recombinaison, il a été suggéré comme un nouveau groupe de VIH-1 appelé P (Plantier et al., 2009)

Actuellement, le groupe M qui représente plus de 95% des isolats globaux, est à son tour divisé en au moins onze sous-types (A1, A2, B, C, D, F1, F2 G, H, J et K). Un sous-type rassemble des souches ayant plus de 80% d'homologie génétique entre elles. De plus, il existe plus d'une quarantaine de formes circulantes recombinantes (CRFs) répertoriées au sein du groupe M (McCutchan, 2000),(www.hiv.lanl.gov). Le sous-type B est le plus répandu en Occident, le sous-type C en Afrique de l'Est et en Inde; quant à l'Afrique, tous les sous-types y sont représentés.

Le groupe O a été retrouvé chez des individus vivant au Cameroun, au Gabon et en Guinée Équatoriale; leur génome possède 65% d'homologie avec les virus M (Takehisa et al., 1999). Au début de l'épidémie, le groupe O était responsable de plus ou moins 20% des cas d'infections au Cameroun, mais de nos jours, il n'en représente que 1% (Vergne et al., 2003). Le groupe N a été observé uniquement au Cameroun (Roques et al., 2004)

C. VIH-Généralités

1. Structure

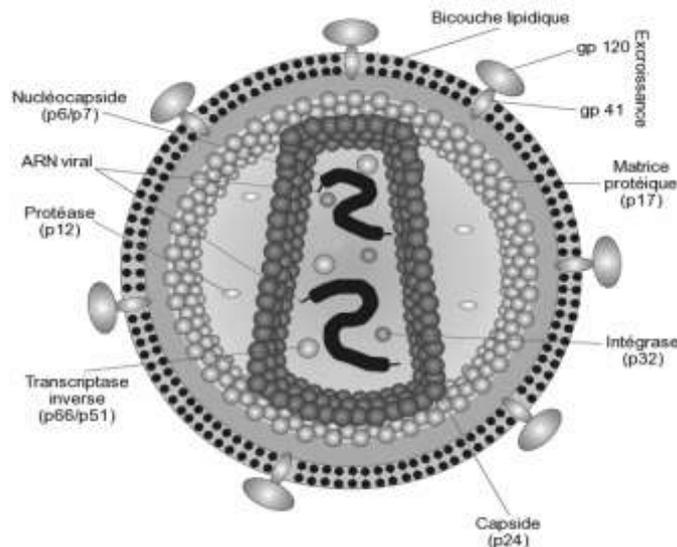
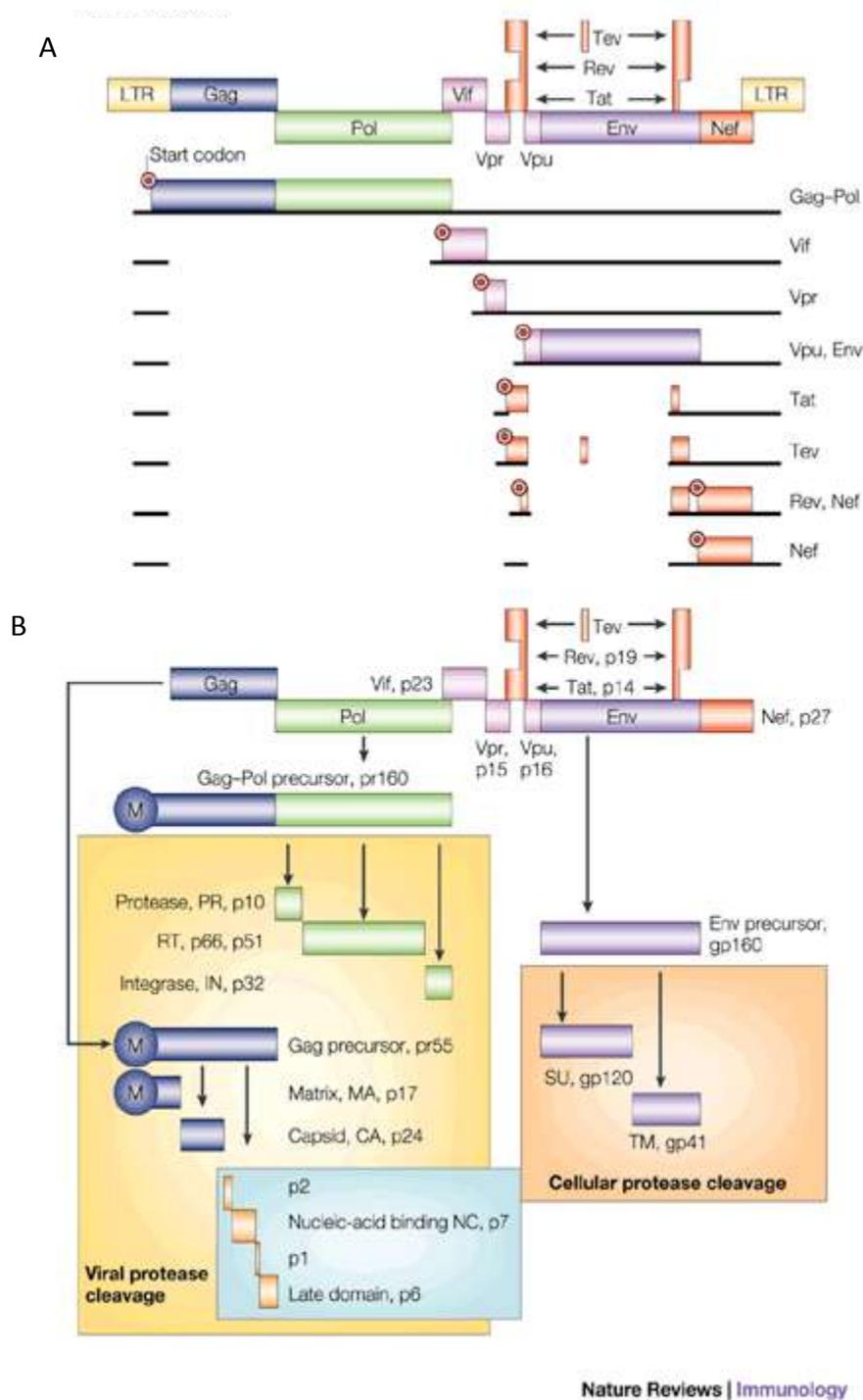


Figure 2: Structure du VIH

D'après: Daniel Beyer francisé par Idavol
http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Hiv_gross.png

Le virus de l'immunodéficience humaine appartient à la famille des rétrovirus et à la sous-famille des lentivirus, virus qui provoquent des maladies à évolution lente et qui sont cytopathogènes en culture. Les VIH ont un aspect sphérique et un diamètre variant entre 90 et 120 nanomètres. Ils disposent d'une enveloppe provenant de la membrane de la cellule infectée, recouverte par des glycoprotéines virales, indispensables à la reconnaissance virus-cellule hôte. À l'intérieur, le corps viral (core) est composé des protéines de la matrice (MA) qui tapissent la face interne de l'enveloppe contribuant à la structure virale, il contient aussi la capside (CA) et la nucléocapside (NC). Les enzymes nécessaires à la réplication virale: Réverse transcriptase, Protéases et Intégrase sont encapsidées (figure 2). Chaque particule virale possède deux copies du génome viral constitué d'une molécule d'ARN, étroitement associées à des protéines de la nucléocapside (NC), qui les réunissent et les protègent de l'activité des enzymes cellulaires.

2. Organisation génétique des VIH-1



D'après (Peterlin et Trono, 2003)

Figure 3: Génome, transcrits et protéines du VIH

A: Génome viral et les transcrits viraux. Les lignes noires représentent les ARN épissés et non-épissés, sur les lignes les codons d'initiation et les séquences codantes sont représentés.

B: Protéines virales

Le génome du VIH sous forme d'ADN est long de 9600pb, constitué d'une région codante qui permet l'expression de neuf gènes et des régions non codantes situées en 5' et en 3' appelées les LTR (Long Terminal Repeat) (figure 3A).

a) Région non codante

Les LTR, sont des éléments ADN constitués de trois régions principales: U3, R et U5. Ces LTR, bien qu'identiques en séquence, jouent des rôles différents suivant qu'ils se situent en 3' ou 5'. La région 5' du LTR est impliquée dans la régulation de l'expression des gènes viraux, elle contient dans sa région U3 la « boîte TATA » essentielle pour l'initiation de la transcription. Cette région contient également plusieurs sites de fixation de facteurs de transcription dont SP1 et NF-κB.

Par ailleurs, dans la région R du LTR se trouve une région de 59 nucléotides qui code pour la séquence TAR, une boucle d'ARN en forme d'épingle à cheveu qui se forme spontanément à l'extrémité 5' de tous les ARNm natifs et qui est indispensable au contrôle de la transcription virale (Berkhout et Jeang, 1989).

En aval de la région 5' LTR de l'ARN génomique se trouvent aussi le PBS (Primer Binding Site) qui est nécessaire à la transcription inverse, la région de dimérisation DIS (Dimerisation Initiation Site) qui forme le dimère d'ARN génomique par interaction avec la séquence DIS d'un autre ARN, ainsi que le site donneur d'épissage SD (Donor Site), servant à la maturation des ARNm. Au sein du gène *env* se situe un élément de réponse à la protéine régulatrice Rev, le RRE (Rev Responsive Element). Ce RRE forme une structure secondaire qui interagit directement avec Rev, permettant l'export des ARNm viraux non ou partiellement épissés (contenant le RRE) vers le cytoplasme.

b) Région Codante

Le génome du VIH permet l'expression de trois gènes communs à tous les rétrovirus, *gag*, *pol* et *env* codant respectivement pour des protéines constitutives (figure 3B):

- Le gène ***gag* (group-specific antigen)** code pour une polyprotéine précurseur nommée la Pr55^{gag} qui est ensuite clivée par la protéase virale en trois protéines: la matrice (MA ou p17), la capsid (CA ou p24), la nucléocapsid (NC ou p7-p9). Il code aussi pour le peptide p6, ainsi que pour deux peptides espaceurs le p2 et le p1. Cette polyprotéine est à l'origine de la structure du virus; elle joue un rôle majeur lors de la

maturation de la particule virale. En absence de l'expression des autres gènes viraux, la polyprotéine Gag seule est suffisante pour créer des particules virales non infectieuses (Virus Like Particules) (Gheysen et al., 1989) (Adamson et Freed, 2007)

- Les enzymes intervenant dans la réplication virale sont synthétisées par une protéine précurseur, la Pr160^{Gag-Pol}, codée par le gène **Gag-pol**, dont le clivage aboutit à l'expression de la transcriptase inverse (RT ou p51-p66), l'intégrase (Int ou p31) et une aspartyl protéase, la protéase virale (Prot ou p12).
- Le produit du gène **env (enveloppe)**, est un précurseur polyprotéique, le Pr160, synthétisé dans le réticulum endoplasmique. Cette polyprotéine est ensuite glycosylée lors de son passage dans l'appareil de Golgi où elle va être clivée par des protéases cellulaires. Le clivage de Pr160 aboutit à l'expression des glycoprotéines externes de l'enveloppe: la glycoprotéine de surface SU ou gp120, indispensable pour l'accrochage à la cellule hôte et la glycoprotéine transmembranaire TM ou gp41, essentielle pour catalyser la fusion membranaire entre la cellule hôte et le virus (Freed, 2001). La protéine gp120 est organisée en cinq régions conservées (C1-C5) et cinq régions variables (V1-V5) (Weiss et al., 1990). La protéine gp41 est composée de trois domaines, l'ectodomaine composé à son tour du peptide de fusion et de deux régions HR1 et HR2 (Heptad Region) indispensables pour la fusion membranaire virus-cellule hôte, le domaine transmembranaire et une queue cytoplasmique (Chan et al., 1997). Les protéines gp120 et gp41 sont liées entre elles de manière non covalente. Une association de trois gp120 et trois gp41 forme la spicule virale qui est nécessaire à l'entrée du virus dans la cellule. (Liu et al., 2008).

En plus des trois gènes rétroviraux classiques, il existe six gènes spécifiques du VIH, *Vpu* (ou *Vpx* pour VIH-2) *Vif*, *Vpr*, *Rev*, *Tat* et *Nef* qui codent pour des protéines dites accessoires, lesquelles, par différents mécanismes, rendent l'infection virale plus efficace (figure 3B).

- **Tat (Transactivator of transcription)** est une petite protéine de taille variable (entre 86-101 A.A), elle est le principal modulateur de la transcription de gènes viraux (Pumfery et al., 2003) (Romani et al., 2010). Tat est l'unique transactivateur du VIH-1, qui se lie sur l'élément TAR. L'élément TAR se configure en boucle dès que l'ARNm commence à être synthétisé. Cette interaction ainsi que le recrutement d'autres facteurs cellulaires, activent fortement la transcription virale, qui peut être

augmentée de plusieurs milliers de fois par la présence de Tat (Cullen, 1990). Cette action trans-activatrice de Tat implique un déroulement de la transcription virale en deux phases, l'une basale non dépendante de Tat et l'autre plus tardive et plus efficace dépendante de Tat. Pour activer la transcription virale, Tat agit comme un adaptateur entre l'ARN viral et des protéines cellulaires impliquées dans la transcription des gènes de la cellule (Rana et Jeang, 1999). En particulier, Tat interagit avec la cycline T1 qui stimule la progression de l'ARN polymérase II cellulaire le long du génome viral et augmente la synthèse des ARNm viraux. En effet, en l'absence de Tat, l'ARN polymérase II est capable d'initier la transcription du LTR viral, mais de manière inefficace. Par sa liaison à la cycline T1, Tat recrute l'enzyme Cdk9 (Cyclin-dependent kinase 9), qui va induire la phosphorylation du domaine carboxy-terminal de l'ARN polymérase II et ainsi augmenter sa processivité le long du génome viral. Par ailleurs, Tat recrute un complexe d'histones acétyltransférases, qui induisent un remodelage de la chromatine et permettent l'accès de l'ARN polymérase II sur la séquence virale (Jeang et al., 1999)(Deng et al., 2000) (Pumfery et al., 2003). De ce fait, Tat joue un rôle important sur la structure de la chromatine, dont la modification exerce un effet sur la transcription. Les protéines acétyltransférases recrutées peuvent directement acétyler Tat, ce qui lui permet d'établir des interactions stables avec l'ARN viral et/ou avec des facteurs cellulaires, pour promouvoir l'élongation de la transcription (Hetzer et al., 2005).

- **Rev (Regulator of expression of the virion)** est une protéine de 116 A.A exprimée durant la phase précoce du cycle de réplication. Elle module l'expression des gènes viraux principalement en régulant le transport des ARNm du noyau vers le cytoplasme. En effet, dans les cellules eucaryotes, mise à part quelques exceptions, l'ARN transcrit doit subir une phase d'épissage de tous les introns avant d'être exporté dans le cytoplasme évitant ainsi la formation des protéines non fonctionnelles. En absence d'un mécanisme permettant de contourner ce système, les ARN viraux partiellement ou non épissés ne pourront pas atteindre le cytoplasme. La protéine Rev est l'élément qui coordonne l'export de ces ARN du noyau vers le cytoplasme (Malim et al., 1989) (Fischer et al., 1995). Rev est traduite à partir d'un petit ARNm mature multi épissé capable d'être exporté vers le cytoplasme. Une fois traduite dans

le cytoplasme, la protéine Rev interagit avec l'importine β via son domaine NLS (Nuclear localisation signal) et franchit les pores nucléaires. Dans le noyau, la protéine Rev se dissocie de l'importine β et se lie à l'ARN viral au niveau de la séquence RRE (Rev Responsive Element) puis à la protéine CRM1 par le domaine NES (Nuclear export signal). Le complexe Rev-CRM1-ARN est exporté à travers les pores nucléaires vers le cytoplasme de la cellule où les ARNm seront traduits ou encapsidés pour donner les nouvelles particules virales.

- **Vpu** (Viral Protein U) est une protéine impliquée dans le relargage des nouveaux virions formés. Son mécanisme d'action a été récemment élucidé. En effet, la Tetherine est une protéine cellulaire induite par l'IFN- α qui possède une activité antivirale en bloquant le relargage des nouveaux virions (Neil et al., 2008), la protéine Vpu inhibe l'effet antiviral de la Tetherine en induisant sa dégradation lysosomiale (Douglas et al., 2009). Cette dégradation a comme résultat un relargage efficace des nouveaux virions.
- La protéine **Vpr** (Viral Protein R) est une protéine exprimée tardivement dans le cycle de réplication viral, elle est cependant présente en grande quantité dans la capsid virale (Cohen et al., 1990). Plusieurs rôles lui ont été attribués dans la réplication virale; le premier élucidé est celui joué lors du transport du complexe de pré-intégration (PIC) dans le noyau cellulaire (Vodicka et al., 1998): Vpr se déplace simultanément avec le PIC à travers le cytosquelette et s'accumule dans la région proche des centrosomes. La protéine interagit alors avec la machinerie cellulaire, notamment avec l'importine, pour activer l'import du PIC dans le noyau (Heinzinger et al., 1994)(Le Rouzic et al., 2002)(Nitahara-Kasahara et al., 2007). Vpr est aussi connue pour interrompre le cycle cellulaire à la phase G₁, en inhibant la déphosphorylation de la cycline B1 (Goh et al., 2004), (Belzile et al., 2007); ceci apporte un avantage réplcatif au virus car le taux de transcription du virus est optimal dans cette phase cellulaire (Pandey et al., 2009). D'autres rôles ont été évoqués pour la protéine Vpr tel que l'induction de l'apoptose (Jacotot et al., 2000), la suppression de l'activation immunitaire par le biais de l'arrêt du cycle cellulaire (Muthumani et al., 2005), la capacité à moduler l'expression de certains gènes cellulaires et d'activer le LTR viral pour favoriser l'expression de gènes viraux (Zhu et

al., 2001) .

- **Vif (Virus Infectivity Factor)** est une protéine de 192 A.A, exprimée en grande quantité dans le cytoplasme des cellules infectées. Son rôle dans la réplication virale est celui de bloquer l'effet antiviral de la protéine cellulaire APOBEC3G (Apolipoprotein B mRNA-editing enzyme catalytic polypeptide-like 3G). APOBEC3G est une défense anti-VIH innée capable d'entrer dans la capsid virale via une interaction avec la protéine Gag (Alce et Popik, 2004). Il a été montré que les virus VIH déficients pour Vif incorporent cette protéine, les rendant non infectieux, alors que les virus exprimant Vif ne l'incorporent pas (Mariani et al., 2003) l'interaction directe Vif-APOBEC3G induit la polyubiquitination de la protéine APOBEC3G et donc sa dégradation par le protéasome cellulaire (Cullen, 2006).
- **Nef (Negative Regulator Factor)** est une protéine de 27KDa produite en abondance dans la phase précoce du cycle de réplication du VIH. Elle est essentielle pour maintenir une forte charge virale. Des études sur le SIV ont montré qu'un mutant délété de Nef retarde ou empêche le développement du SIDA chez le macaque adulte (Kestler et al., 1991)(Daniel et al., 1992). En effet, Nef est impliquée dans la down régulation de différentes molécules de surface tel que CD4 (Garcia et Miller, 1991), CD8 (Stove et al., 2005), CD28(Swigut et al., 2001), des protéines du CMH de classe I et classe II (Schwartz et al., 1996) (Schindler et al., 2003). La modulation a un effet direct sur la réponse immunologique anti-VIH. En effet, si les cellules infectées par le virus n'expriment pas le CMH de classe I, elles seront protégées contre la lyse par les Lymphocytes T CD8 cytotoxiques spécifiques des antigènes du VIH. En outre, la diminution des récepteurs CD4 est importante pour prévenir la séquestration des nouveaux virus produits après bourgeonnement. Ce mécanisme permet de faciliter la dissémination du virus pour aller infecter de nouvelles cellules (Salghetti et al., 1995). D'autre part, Nef interagit avec la molécule de CD40 exprimée par les macrophages, provoquant leur activation et un relargage de chimiokines, les cellules immunitaires sont ainsi attirées ce qui favorise leur infection (Swingler et al., 2003).

3. Cycle de réplication virale dans la cellule hôte.

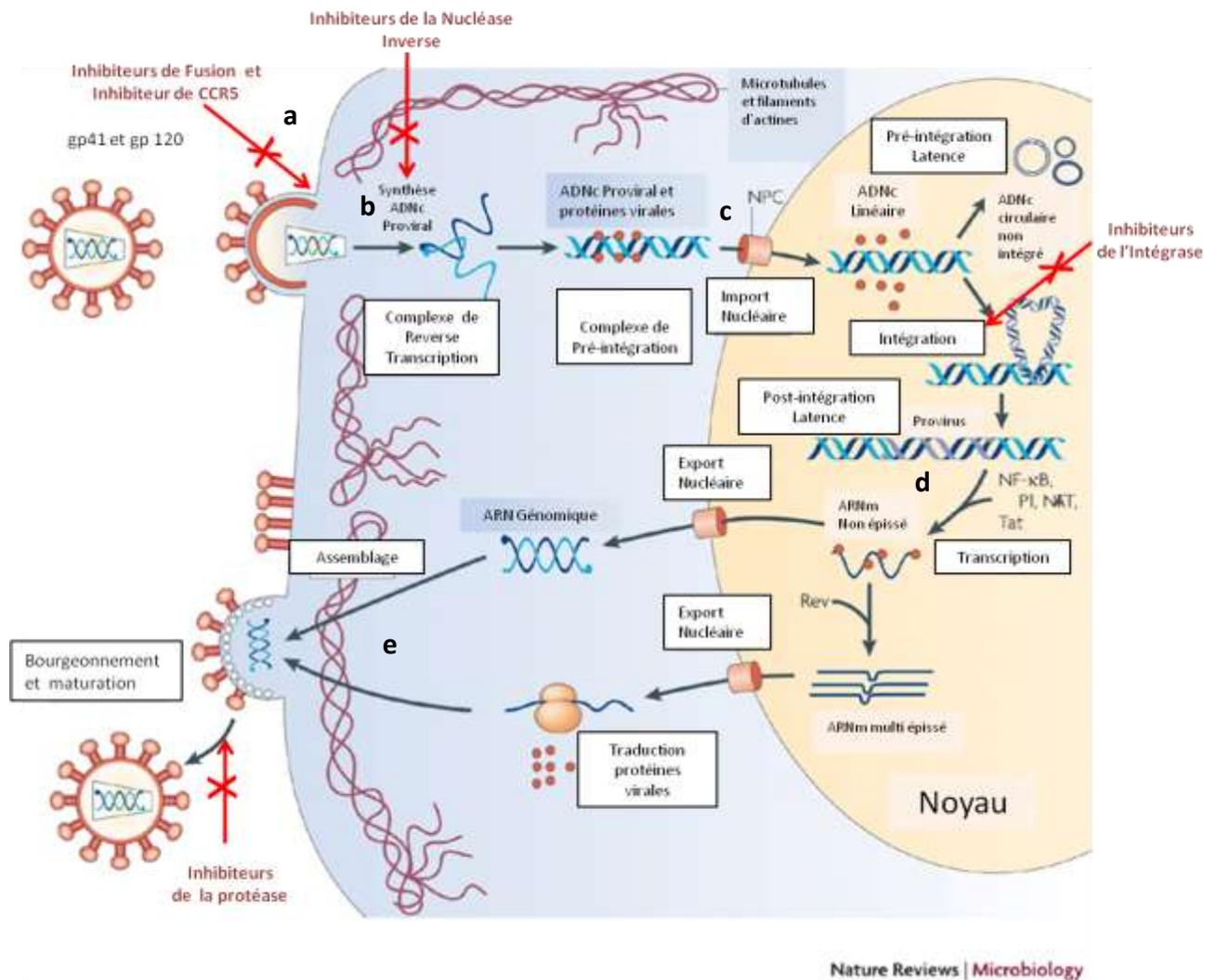


Figure 4: Cycle réplcatif du VIH

Les flèches rouges représentent les cibles thérapeutiques des molécules antirétrovirales

Les étapes de a) à e) indiquées dans le schéma seront détaillées dans cette partie.

D'après : (Coiras et al., 2009)

a) Entrée du Virus

Le cycle de réplication du VIH commence par la fixation et la pénétration du virus dans la cellule hôte. Cette étape est possible grâce à la forte affinité existant entre la glycoprotéine de la spicule virale gp120 et le récepteur du VIH (figure 5A), le CD4. La protéine gp120 associée en trimères dans la bicouche lipidique virale, interagit avec trois molécules CD4 sur la membrane cellulaire (figure 5B). Cette liaison stabilise le contact entre le VIH et la cellule hôte et provoque un changement de conformation de la gp120, favorisant la fixation de celle-ci avec les corécepteurs du VIH (figure 5C)

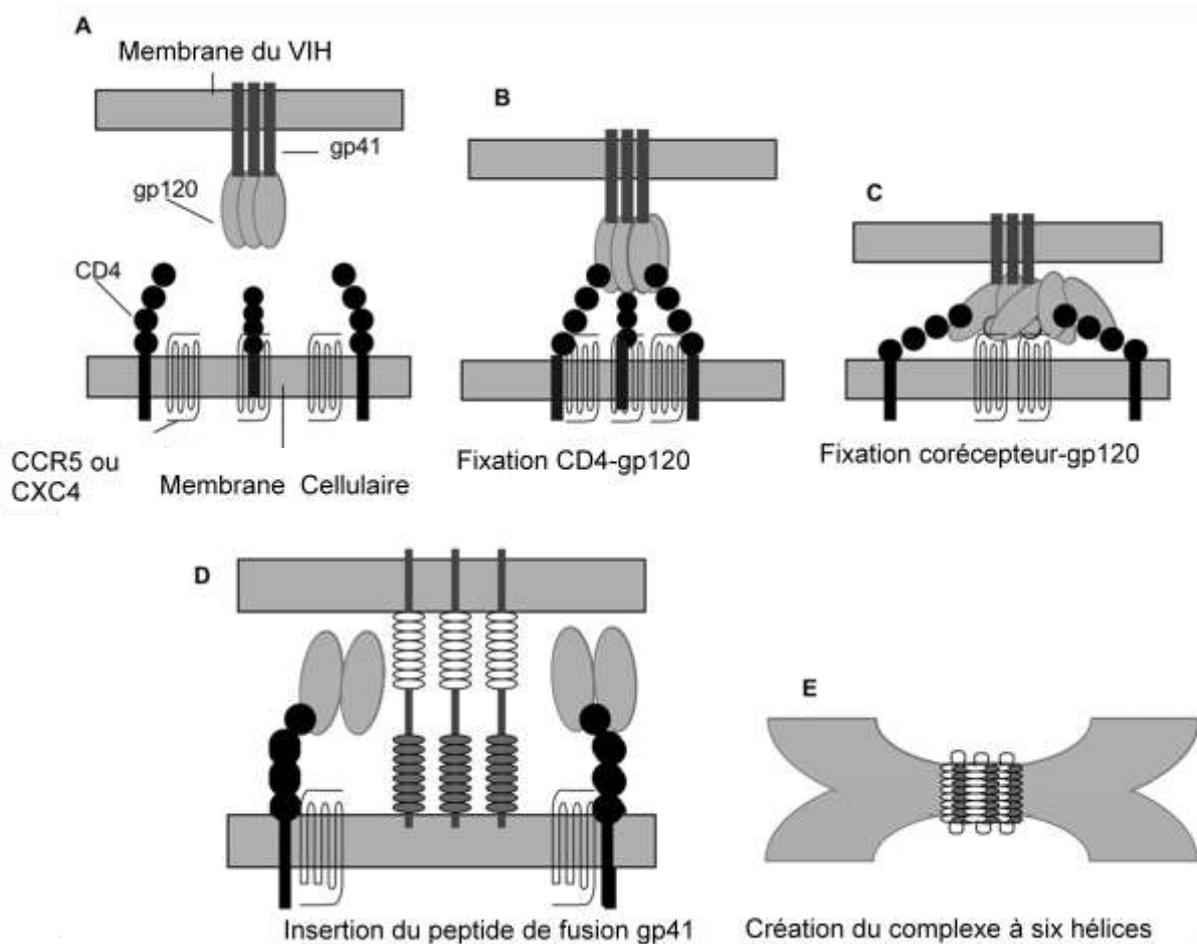


Figure 5: Mécanisme d'entrée du VIH dans la cellule.

D'après (Alkhatib, 2009)

Les corécepteurs du VIH ont été identifiés comme des membres de la famille des récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés aux protéines G. Leur principale fonction consiste à lier les chimiokines de type CC ou CXC. Plusieurs molécules de ce type ont été décrites comme possibles corécepteurs du VIH, tel que le CCR5, CXCR4, CCR2b, CCR3, CCR8, API, CXCR6 (Bonzo, STRL33), GPR15 (BOB) et US28 (Berger et al., 1999). Cependant, seul le CXCR4 récepteur des α -chimiokines (Feng et al., 1996) et le CCR5 récepteur des β -chimiokines (Alkhatib et al., 1996) (Choe et al., 1996) (Dragic et al., 1996) sont impliqués dans l'infection virale.

Les VIH capables d'infecter uniquement les cellules exprimant le CXCR4⁺ ont été identifiés comme X4 (tropisme T), les souches infectant seulement les cellules CCR5⁺ sont appelées R5

(tropisme M) et il existe des virus capables d'infecter les cellules exprimant l'un ou l'autre corécepteur, on parle alors de virus R5X4 (Dual). Le virus VIH infecte préférentiellement les cellules qui expriment CD4 et l'un ou l'autre des corécepteurs, cependant quelques études montrent que l'infection des cellules dépourvues de CD4 est possible (Bhattacharya et al., 2003). Les macrophages expriment CD4, CCR5 et CXCR4 à leur surface mais seules les souches R5 peuvent les infecter (Goodenow et Collman, 2006). Les lymphocytes T CD4⁺ expriment des quantités élevées de CD4 et des niveaux variables de CXCR4 et CCR5 (selon l'état d'activité cellulaire). Les lymphocytes T CD4⁺ naïfs et mémoires quiescents, par exemple, expriment préférentiellement le corécepteur CXCR4 alors que les lymphocytes T CD4⁺ effecteurs expriment simultanément les deux corécepteurs CCR5 et CXCR4 et constituent des cibles préférentielles du virus. Il a été montré que les lymphocytes mémoires effecteurs résidant dans les tissus non lymphoïdes (tractus gastro-intestinal et poumons) expriment des niveaux élevés de CCR5, ce qui en font des cibles du virus (Douek et al., 2003).

La liaison gp120 avec les corécepteurs viraux entraîne un changement de conformation de la protéine gp120 provoquant la libération de la gp41, qui insère son peptide de fusion (peptide N terminal hydrophobe), dans la membrane cellulaire (figure 5D) (Weissenhorn et al., 1997). La gp41 se configure ensuite en un complexe à six hélices (figure 5E) entraînant la juxtaposition des membranes virales et cellulaires. La proximité membranaire ainsi que l'énergie libérée lors du réarrangement structurel sont suffisants pour perméabiliser les membranes et permettre leur fusion (Panos et Nelson, 2008).

b) Transcription inverse

Après la fusion membranaire, la nucléocapside est relarguée dans le cytoplasme où commence l'étape de transcription inverse; celle-ci se déroule à l'intérieur de la capsid virale après que cette dernière soit entrée dans le cytoplasme. L'étape de transcription inverse, caractéristique des rétrovirus, a lieu majoritairement dans le cytoplasme de la cellule hôte mais est initiée dans la particule virale (Lori et al., 1992). Pendant cette phase de retrotranscription on observe aussi une réorganisation des protéines de la matrice ainsi qu'un relargage des protéines de la capsid (Stevenson, 1996) (Bukrinsky, 2004) (Arfi et al., 2009). L'ARN viral est alors retrotranscrit en ADNc bicaténaire par la catalyse de la reverse transcriptase virale. L'affinité de la RT pour le brin ARN transcrit est relativement faible et durant la phase de transcription, la RT est capable de commuter d'un brin d'ARN à un autre;

si les deux molécules d'ARN ne sont pas génétiquement identiques dans un virion, on peut aboutir à la génération d'un nouvel ADN recombinant (Negroni et Buc, 2001)(Basu et al., 2008). De plus, la réverse transcriptase est une enzyme peu fidèle, capable d'introduire un taux important d'erreurs de transcription ($3 \cdot 10^{-5}$ par cycle)(Mansky, 1996).

Ces deux caractéristiques fonctionnelles de l'enzyme sont à l'origine de la grande variabilité de la population VIH (ou quasi-espèce) au sein d'un même individu infecté.

c) Intégration du génome viral

L'étape de décapsidation suit la transcription inverse (Arhel et al., 2007). Cette étape est encore mal comprise, mais elle semble passer par des modifications de la protéine de la capsidie qui subit des phosphorylations par des MAP kinases (Cartier et al., 1999).

Suite à la décapsidation se forme un complexe de préintégration (PIC) constitué de l'ADN viral néoformé, les protéines virales de la matrice (MA), l'intégrase (IN), la nucléocapsidie (NC), la protéine Vpr et des protéines cellulaires telles que HMGs (High-Mobility Group protein), LAP2 α (Lamina-associated polypeptide 2 α), BAF (Barrier to autointegration factor) (Suzuki et Craigie, 2007). Le transport du PIC vers la membrane nucléaire se fait à travers les filaments d'actine du cytoplasme (Goff, 2001). Le mécanisme par lequel le PIC est importé dans le noyau n'est pas encore totalement élucidé. Il existe un consensus pour penser que le transport se fait par le pore nucléaire, cependant, du fait de sa grande taille (estimé à 32KDa), le PIC ne peut pas être transporté de manière passive. Les protéines MA, IN et notamment la protéine Vpr du PIC ainsi qu'une région centrale de l'ADN viral (cPPT), contiennent des signaux karyophiles et sont impliquées dans l'import nucléaire actif. Leur interaction avec l'importine et la nucléoporine induirait un transport GTP dépendant à travers les pores nucléaires (Suzuki et Craigie, 2007)

Une fois dans le noyau l'IN catalyse l'insertion de l'ADN viral dans le génome cellulaire. L'intégration cellulaire commence par le processing de l'ADN viral avec l'élimination de deux nucléotides des extrémités 3' des deux brins d'ADN créant des ADN à extrémités débordantes. L'IN catalyse ensuite le transfert des brins, étape dans laquelle l'ADN viral s'insère dans le génome cellulaire. Elle commence par un clivage de l'ADN cellulaire permettant au provirus de s'incorporer dans le génome. Les enzymes cellulaires réparent ensuite les coupures entre l'ADN viral et l'ADN génomique (Delelis et al., 2008). Une fois le

provirus intégré dans le génome cellulaire, son mode de fonctionnement va être celui d'un gène cellulaire (Van Maele et Debyser, 2005).

d) Transcription et traduction des protéines virales

La régulation de l'expression du génome viral se fait par le biais du promoteur LTR (Quivy et al., 2007) (Kilareski et al., 2009). Il existe deux phases de transcription, la phase précoce ou basale avant que les protéines virales soit synthétisées et la phase tardive qui met en jeu les protéines virales. De nombreux facteurs de régulation de la transcription peuvent induire l'expression du génome viral. Lors de la phase précoce de transcription, l'un des principaux facteurs de régulation dans les lymphocytes T activés est le facteur de transcription NF- κ B qui est normalement impliqué dans la régulation de nombreux gènes de la réponse immune lors des processus d'inflammation (Alcamí et al., 1995). D'autres facteurs de transcription, comme NFAT et AP-1 (activator protéine-1), sont également impliqués dans l'activation de la transcription du génome viral. Lors de la phase tardive de la transcription, des facteurs de régulation viraux interviennent. Ainsi la protéine Tat augmente considérablement le taux de transcription des ARN viraux en améliorant l'efficacité du complexe de transcription et la processivité de l'ARN polymérase.

La transcription aboutit à la génération de plus de 30 ARN différents (Purcell et Martin, 1993) qui peuvent se séparer principalement en trois classes (figure 3A) :

- Un ARN non épissé qui fonctionne d'une part comme ARN messager codant pour les précurseurs des polyprotéines Gag et GagPol et d'autre part comme génome virale des nouveaux virions.
- Des ARN messagers partiellement épissés qui vont coder pour Env, Vif, Vpu et Vpr
- Et des ARN messagers multiépissés codant pour Rev, Tat et Nef

L'export dans le cytoplasme des ARN différemment épissés sera médié par la protéine Rev. La traduction des ARNm par les protéines cellulaires conduit ensuite à la formation des précurseurs des protéines Pr55^{Gag} Pr160^{Gag-Pol} et Pr160 ainsi qu'à la synthèse de protéines accessoires.

e) Assemblage et relargage de la nouvelle particule virale

L'assemblage de la nouvelle particule virale est principalement orchestré par le précurseur protéique Pr55^{gag} (Figure 6) (Freed, 1998). Il se produit dans la membrane cellulaire, plus exactement au niveau des radeaux lipidiques (Ono et Freed, 2001) (Bukrinskaya, 2004)



Figure 6: Structure du précurseur protéique Pr55^{gag}

Les précurseurs protéiques Pr55^{gag} et Pr160^{gag-pol} (Figure 6), après leur synthèse sont dirigés vers la bicouche lipidique membranaire. En effet, le domaine MA de la polyprotéine Pr55^{gag} (131 acides aminés N terminales) ayant subi une myristilation post traductionnelle va pouvoir s'ancrer de manière stable dans bicouche lipidique grâce à des liaisons hydrophobes (Figure 7) (Ganser-Pornillos et al., 2008)

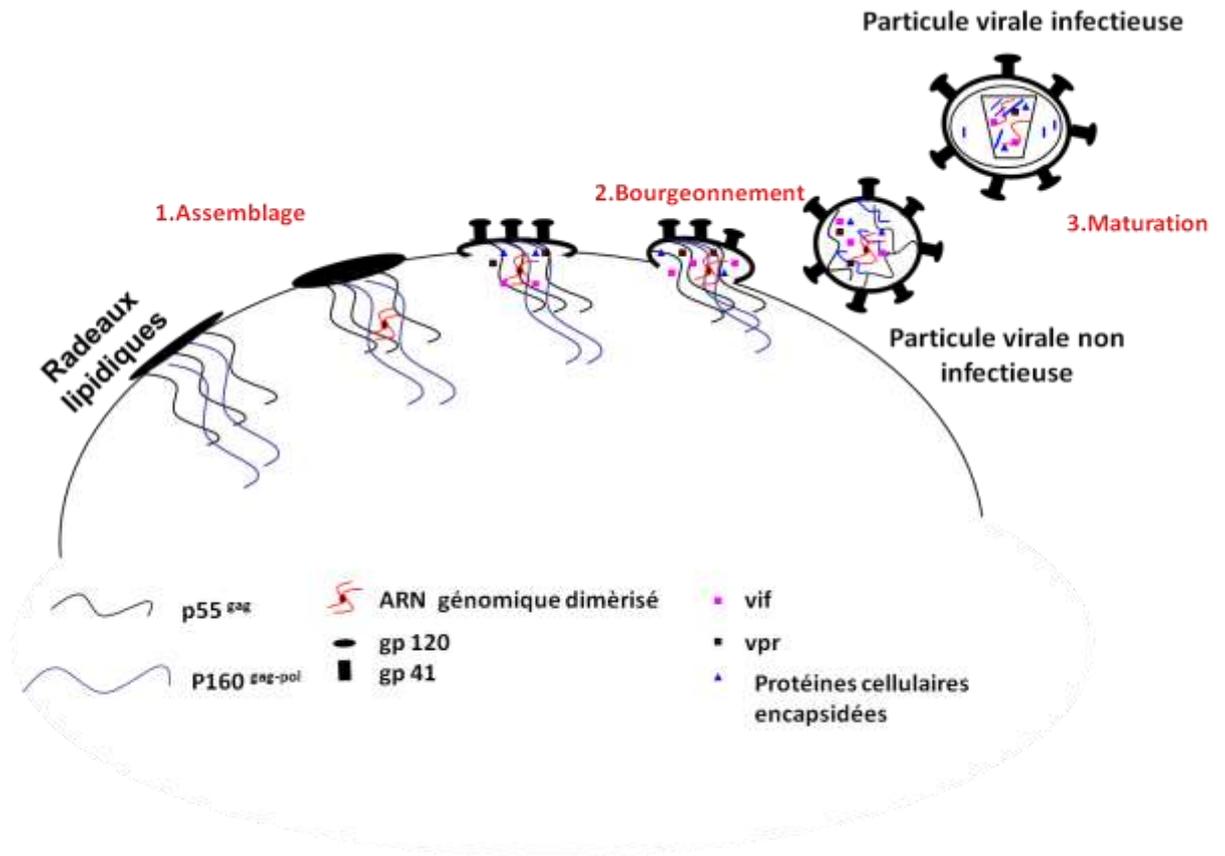


Figure 7: Schéma de l'assemblage, le bourgeonnement et la maturation du VIH.

Adapté de (Bukrinskaya, 2004)

La protéine NC (p7) a pour principale fonction d'encapsider l'ARN viral grâce à une séquence d'encapsidation(Ψ) de 120 nucléotides comprise entre le LTR 5' et le codon d'initiation de Gag. Le domaine NC de la polyprotéine possède deux motifs en doigt de Zinc capables de fixer la séquence Ψ de l'ARN viral de manière spécifique. A cette interaction s'ajoutent d'autres interactions non spécifiques entre l'ARN viral et des domaines basiques de la NC encadrant les domaines en doigt de Zinc, assurant leur amarrage (Freed, 2001).

L'incorporation d'Env dans les nouvelles particules se fait grâce à des interactions entre la protéine MA et la queue cytoplasmique de gp41 (Freed 1998).

Le bourgeonnement et le relargage (figure 6) de la nouvelle particule virale se font grâce au domaine p6 de la p55^{Gag} qui recrute des protéines cellulaires du complexe ESCRT (**E**ndosomal **S**orting **C**omplex **R**equired for **T**ransport), normalement intervenant dans la voie d'endocytose cellulaire et qui dans le cadre de la réplication virale va entraîner les fissions des membranes

et le relargage de la nouvelle particule (Perez-Caballero et al., 2009).

Pour devenir infectieuse, la particule virale doit subir une étape postérieure de maturation. La protéase virale clive les polyprotéines pendant et juste après le bourgeonnement. Le premier clivage est intramoléculaire et va libérer la protéase de la polyprotéine Gag-Pol (Pettit et al., 2004). Lors de cette libération, la protéase se dimérise et devient capable de catalyser le clivage de Gag et Gag-Pol pour aboutir à la libération des protéines structurelles et fonctionnelles.

Cette étape de maturation a comme conséquence un réarrangement spatial de la particule. En effet, la capsid (CA) va assurer la cohésion mécanique des virions. Les protéines CA dimérisées vont ensuite s'associer par leurs domaines C-terminaux en anneaux d'hexamères qui vont donner la forme conique de la capsid (Huseby et al., 2005). La particule virale créée est alors infectieuse (Freed, 2001).

4. Histoire Naturelle du VIH

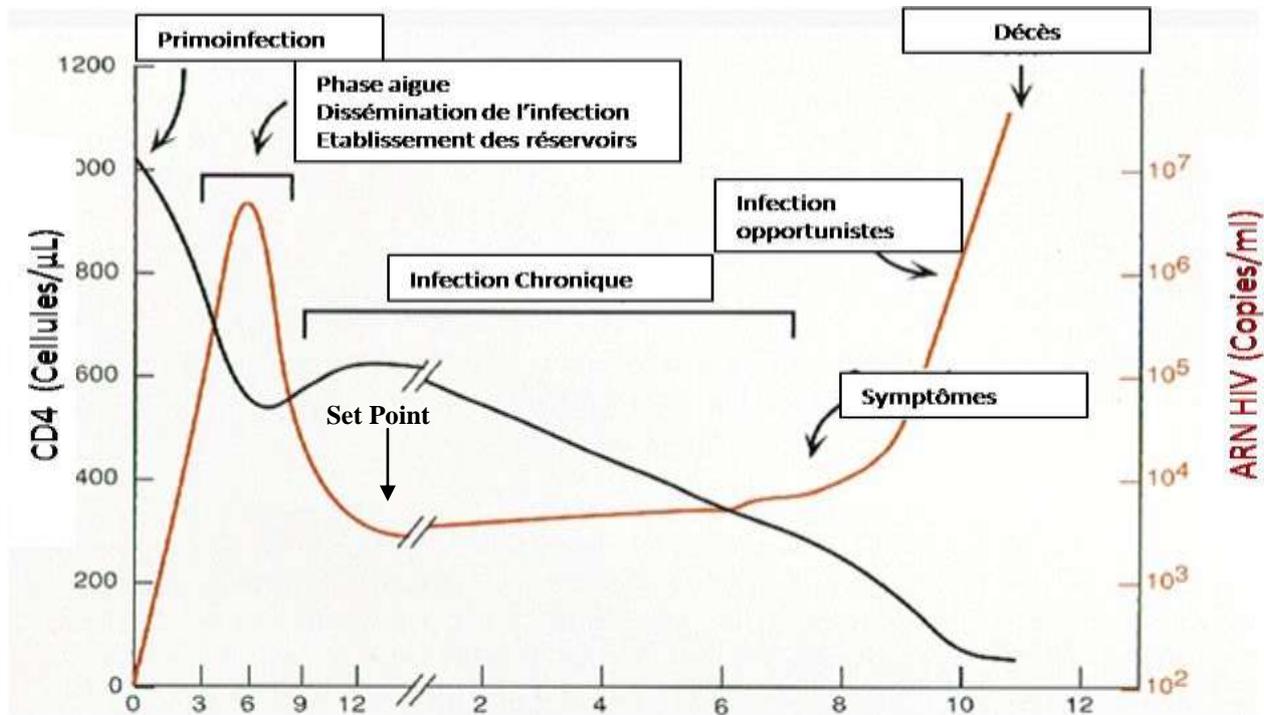


Figure 8: Histoire Naturelle du VIH

Temps après l'infection

La courbe noire représente l'évolution du nombre de CD4 (cellules / μL) et la courbe rouge représente l'évolution de la charge virale (copies d'ARN viral /ml)

(D'après : www.retrovirus.info Modifié de Pantaleo et al. 1993)

La porte principale d'entrée du virus dans l'organisme est la muqueuse. Chez les femmes, cette invasion se fait principalement au niveau de l'épithélium squameux non kératinisé du vagin et de l'exocol. Chez les hommes, l'invasion virale se produit principalement au niveau de la partie interne du prépuce qui est composée d'une fine couche d'épithélium squameux non kératinisé. Pour l'homme et la femme, le virus peut également infecter la fine couche d'épithélium rectal en cas de rapport anal réceptif (Hladik et McElrath, 2008). Le virus entre en contact des cellules épithéliales de la muqueuse soit sous forme de virion libre soit par l'intermédiaire de cellules infectées du donneur, capables de fabriquer des nouveaux virions, présents dans les liquides biologiques.

Lorsque la muqueuse réceptive est intacte, les virus peuvent pénétrer la couche épithéliale non kératinisée par transcytose, le virion est alors internalisé dans une cellule de la couche épithéliale superficielle, transporté par la voie vésiculaire de cette cellule et relâché dans l'interépithélium. Dans certaines conditions physiologiques, la muqueuse peut présenter des micro abrasions permettant aux virions ou aux cellules infectées de migrer directement vers l'épithélium interne de la muqueuse. Cette zone interne de la muqueuse présente un environnement propice pour l'infection. En effet, elle représente l'interphase entre l'hôte et l'extérieur et constitue une barrière immunologique contre les infections, c'est pourquoi les cellules immunitaires s'y trouvent fortement représentées. En particulier, les cellules T CD4⁺ mémoires, quiescentes et effectrices, les cellules de Langerhans, cellules dendritiques stromales et les macrophages, toutes des cellules cibles du virus. (Hladik et McElrath, 2008).

Le virus rencontre ainsi les cellules exprimant ses récepteurs et corécepteurs et l'infection virale débute. Cependant, pour que l'invasion soit efficace, une population fondatrice de plusieurs cellules infectées doit être établie dans la muqueuse (Haase 2010). La communication entre cellules CD4⁺ et cellules dendritiques contribue à l'établissement d'un tel foyer infectieux (Wu et KewalRamani, 2006). En effet, les cellules dendritiques sont capables de stocker le VIH par trois mécanismes différents:

-Les cellules dendritiques expriment des lectines sur leur membrane, tel que DC-SIGN capables de fixer le virus. Le virion reste alors attaché à l'extérieur de la cellule.

-La cellule dendritique est aussi capable d'internaliser le virus par endocytose et de le conserver intact dans ses corps vésiculaires (McDonald et al., 2003).

-Le VIH peut aussi infecter efficacement les cellules dendritiques et s'intégrer dans son génome, la cellule fabriquera ainsi des nouvelles particules virales.

Dans la muqueuse, une zone de contact directe entre les cellules dendritiques et les lymphocytes CD4⁺ peut se créer, on parle alors de synapse infectieuse. Au sein de cette synapse, les virions stockés dans la cellule dendritiques et les récepteurs viraux sont concentrés, favorisant l'infection des lymphocytes CD4⁺ (Hladik et McElrath, 2008).

Lorsque l'expansion locale est forte, les cellules infectées seront drainées par les vaisseaux lymphatiques vers les organes lymphoïdes secondaires qui deviennent le principal site de production et d'emmagasinage du virus, on parle alors des réservoirs viraux. La

dissémination systémique du virus se produit à partir du drainage des organes lymphoïdes par le système lymphatique ou par le système sanguin vers les différents organes. Cette première étape de dissémination est très rapide, elle dure entre deux et quatre semaines (Haase, 2010).

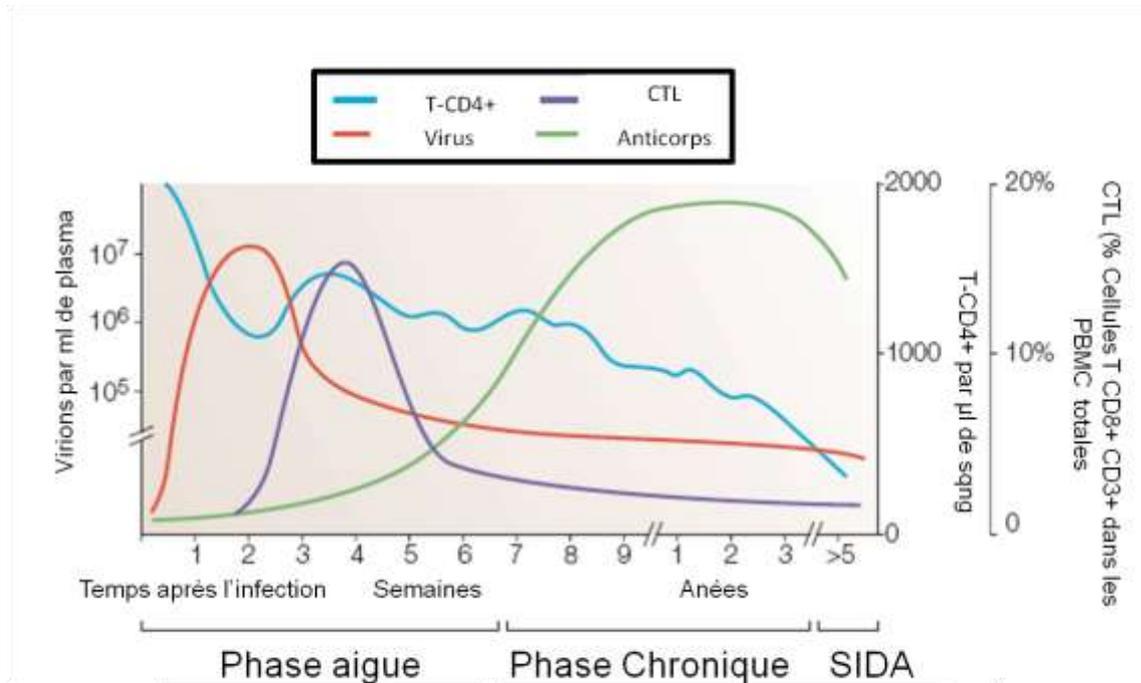
Quand les cellules infectées et les virions libres se retrouvent dans le sang, la réplication virale se traduit par une charge virale plasmatique pouvant atteindre des valeurs de 10^6 copies/ml et par une diminution du taux de lymphocytes $CD4^+$ circulant par l'effet cytopathogène du virus. Cette phase est appelée la phase de primo-infection (figure 8), dans 50% à 75% des cas d'infections elle est symptomatique, le plus souvent se présentant comme une infection virale banale, ressemblant à une mononucléose infectieuse; les symptômes les plus fréquents sont l'adénopathie cervicale et axillaire, une fièvre pouvant persister un mois, sueurs, asthénie intense, des myalgies, un rash cutané, une dysphagie douloureuse, des céphalées, des arthralgies, parfois une candidose avec ulcérations buccales mais les symptômes disparaissent au bout de quelques semaines. Cette multiplication initiale du virus conduit à l'apparition des anticorps anti-VIH définissant la séropositivité, détectables dix à quarante jours après contamination. L'apparition des lymphocytes CTL spécifiques du VIH corrèle avec une diminution de la charge virale plasmatique jusqu'à une valeur stable qui intervient entre trois et six mois après l'infection. Cette valeur appelée le «set point» viral est variable selon les sujets et est prédictive de l'évolution de la maladie (Perrin, 1999).

La phase asymptomatique caractérisée par une stabilisation de la charge virale plasmatique peut durer entre cinq à dix ans, avec deux cas extrêmes: les progresseurs rapides pour lesquels la phase asymptomatique dure entre deux et trois ans et les progresseurs lents (5 à 8% des patients infectés) qui peuvent demeurer asymptomatiques entre dix et quinze ans et qui conservent un taux de lymphocytes T $CD4^+$ supérieur à 500 cellules/ mm^3 . Ces sujets sont appelés non-progresseurs à long terme (LTNP) (Cao et al., 1995). Pendant la phase dite «silencieuse» de la maladie, la réplication virale est permanente ainsi que la déplétion lymphocytaire. Le système immunitaire est capable de répondre à ces phénomènes viraux par une réponse immunitaire spécifique du VIH ainsi qu'une mise en place d'un processus de renouvellement des lymphocytes déplétés. On parle alors d'infection chronique plutôt que d'infection latente.

En absence de traitement, la maladie évolue vers la phase SIDA, définie par une chute du

taux des lymphocytes CD4⁺ et la survenue d'infections opportunistes (bactériennes, virales fongiques et parasitaires) ou de cancers (lymphomes malins non Hodgkiniens, sarcome de Kaposi). La phase SIDA conduit en quelques mois au décès. En principe, toute personne infectée en absence de traitement antirétroviral évolue vers cette phase. Cependant, il existe un nombre restreint de sujets, les «élite contrôleurs», qui ont une charge virale indétectable et un taux de lymphocytes CD4⁺ stable, ils ne représentent que 1/1000 des patients infectés (Grabar et al., 2009). L'étude de ces patients peut apporter des connaissances sur les facteurs immunologiques indispensables à la bonne protection contre le VIH ce qui est déterminant pour la recherche vaccinale.

D. Réponse Immune de l'hôte contre le VIH



Adaptée à partir de : Goulder et al, Nature 2004

Figure 9: Réponse immunologique humorale et cellulaire au cours de l'histoire naturelle du VIH.

1. Réponse humorale spécifique

La réponse humorale spécifique de VIH est constituée d'anticorps dirigés contre toutes les protéines du VIH: des anticorps contre les protéines de l'enveloppe (gp120, gp41), les protéines de la capsid (p24, p18) et contre celles de la matrice, qui deviennent détectables dans le sérum de trois à six semaines après la contamination (Huber et Trkola, 2007). Cependant, la grande majorité des anticorps détectés pendant les premières semaines ne sont pas des anticorps neutralisants (Aasa-Chapman et al., 2004) ; ceux-ci n'apparaissent que très tardivement entre le deuxième et le sixième mois après la primo-infection (Pellegrin et al., 1996)(Pilgrim et al., 1997). La plupart sont dirigés contre des régions variables de l'enveloppe, les virus leur échappent rapidement sans perte de fitness. Il a été montré que les anticorps neutralisants sont efficaces contre des virus ayant été présents dans le sang auparavant mais pas contre la quasi espèce actuelle (Frost et al., 2005).

Les anticorps dirigés contre des régions très conservées telles que le site de liaison au récepteur CD4 de la gp120 ou le MPER (Membrane Proximal External Region), site de fusion de la gp41, ont un pouvoir de neutralisation à très large spectre. L'efficacité anti-virale de ces anticorps a été démontrée par plusieurs études (Muster et al., 1993) (Purtscher et al., 1994) (Zwick et al., 2001), mais la majorité des personnes infectées ne les produisent pas. Il a fallu un effort de criblage intense sur des milliers de personnes afin de trouver les quatre ou cinq anticorps neutralisants à spectre large connus à ce jour (Calarese et al., 2003), (Ofek et al., 2004). De plus, il s'est avéré très difficile d'induire leur production par les différentes stratégies de vaccination (Burton et al., 2004).

2. Réponses cellulaires spécifiques

a) *Lymphocytes T CD4⁺ auxiliaires spécifiques du VIH*

La réponse des lymphocytes T CD4⁺ est indispensable au déroulement de la réponse immune anti-VIH, mais elle a été peu étudiée du fait du déficit quantitatif des cellules CD4⁺ chez les patients immunosupprimés. Cependant, le rôle de la réponse des lymphocytes CD4⁺ auxiliaires dite Th1 capable de produire de l'IL-2 et de l'IFN- γ s'est avéré indispensable chez les sujets asymptomatiques à long terme, chez qui la réponse auxiliaire spécifique anti-VIH est corrélée avec la non progression ou la progression lente de l'infection (Boaz et al., 2002) (Emu et al., 2005) (Martinez et al., 2005). Ces lymphocytes amplifient la réponse cytotoxique contre le VIH et contribuent ainsi au contrôle de la charge virale en primo-infection. Ils exercent aussi une fonction auxiliaire Th1 indispensable dans la production d'anticorps. En effet, le taux de cellules CD4 spécifiques du VIH, ainsi que la présence d'anticorps anti-enveloppe de type IgG2 sont des facteurs de prédiction de la non-progression (Martinez et al., 2005). Cependant, les lymphocytes CD4 mémoires, cellules cibles privilégiées du virus (Mattapallil et al., 2005), disparaissent rapidement après une primo-infection non traitée, probablement du fait de leur infection. L'activation chronique des cellules CD4⁺, peut aussi les conduire à un état d'anergie caractérisé par la surexpression des marqueurs d'épuisement tel que le PD-1 (Day et al., 2006).

b) Lymphocytes T CD8⁺ cytotoxiques spécifiques du VIH

Les lymphocytes T CD8⁺ cytotoxiques(CTL) représentent en général un des principaux effecteurs dans la lutte antivirale. Les mécanismes par lesquels les CTL participent à la suppression virale sont la production d'IFN- γ , la lyse cellulaire par la production de la Perforine et des Granzymes et l'induction de l'apoptose de la cellule infectée via l'interaction Fas-FasL. Différentes observations mettent en évidence l'importance de la réponse CTL contre le VIH dans le contrôle partiel de la réplication virale tout au long de l'histoire naturelle de la maladie.

Dans la phase aiguë, les lymphocytes T CD8⁺ spécifiques du VIH sont détectables chez la majorité des patients infectés par le VIH. Ils sont très rapidement amplifiés jusqu'à atteindre des fréquences de l'ordre de 5 à 10% des lymphocytes CD8⁺ totaux. Les premiers CTL spécifiques du VIH apparaissent au moment où le pic de la charge virale débute sa diminution (Borrow et al., 1994)(Koup et al., 1994). L'apparition de cette première réponse CTL est mise en relation avec l'établissement d'un contrôle partiel de la charge virale (établissement du « set point »). En effet, chez des macaques SIV en primo infection traités par des anticorps monoclonaux dirigés contre les lymphocytes CD8⁺, la phase de stabilisation de la charge virale n'est jamais atteinte et les macaques évoluent rapidement vers le stade SIDA (Jin et al., 1999). En outre, une étude plus récente a montré que les patients présentant des réponses CTL contre des épitopes très conservés du VIH en phase aiguë de l'infection présentent une évolution plus lente de la maladie (Dinges et al., 2010).

Pendant la phase chronique de la maladie, la forte association existant entre les patients ayant certains allèles HLA de classe I et l'absence de progression de la maladie (Carrington et O'Brien, 2003) suggère un lien entre la réponse CTL et le contrôle de la charge virale. En effet, les allèles HLA-B57/HLA-B27 sont surreprésentés dans la population de patients élite contrôleurs et à l'inverse, les allèles HLA-B35Cy sont associés à une évolution rapide de la maladie (Gao et al., 2001) (Scherer et al., 2004) (Kiepiela et al., 2004).

Même s'il est clair que la réponse CTL influence la progression de la maladie, il reste encore difficile d'établir les caractéristiques nécessaires aux lymphocytes cytotoxiques doivent avoir pour être efficaces contre la réplication du virus VIH (Addo et al., 2003):

En premier lieu, il semble que **la protéine ciblée** par la réponse CTL soit importante pour déterminer l'efficacité antirétrovirale de la réponse. En effet, il a été montré que la

réponse CTL spécifique de la polyprotéine Gag corrèle positivement avec une diminution de la charge virale, alors qu'il existe une corrélation négative entre la réponse CTL anti-Env et la charge virale. D'autres réponses CTL ne présentent aucune relation entre leur présence et le contrôle de la réplication virale (Kiepiela et al., 2007). Le rôle bénéfique de la réponse anti-Gag a été attribué à plusieurs facteurs: d'une part, un virion du VIH contient 1000 à 5000 copies des protéines dérivées de Gag (Briggs et al., 2004). Après l'entrée du virus, des épitopes dérivés des protéines de la capsidie peuvent être présentés à la surface de la cellule infectée, une réponse efficace contre cette protéine peut donc éviter la formation de nouveaux virus (Sacha et al., 2007). D'autre part les épitopes cibles au sein de Gag, en particulier l'épitope KK10 présenté dans le contexte HLA-B27 comprennent des parties très conservées du génome viral, dans ce cas les mutations d'échappement apportent un coût répliatif très fort (Martinez-Picado et al., 2006) (Crawford et al., 2007) (Schneidewind et al., 2007).

Un autre facteur jouant un rôle dans la qualité de la réponse CTL est **l'avidité fonctionnelle** qui, dans le cadre de l'infection du VIH, est inversement corrélée à la charge virale. En effet, deux études (Bihl et al., 2006) (Dzutsev et al., 2007) montrent que les CTL ayant une plus grande avidité fonctionnelle pour leur peptide prolifèrent plus rapidement après stimulation par l'antigène que ceux ayant une faible avidité fonctionnelle.

La **polyfonctionnalité** est un dernier facteur qui semble corrélé avec l'efficacité antivirale de la réponse CTL (Betts et al., 2006). Les fonctions impliquées dans le contrôle viral sont la capacité cytotoxique (production de perforine et des granzymes), le relargage des cytokines tel que l'IFN- γ , le TNF- α , l'IL-2 et la production de chimiokines capables de recruter les cellules immunes au site de l'infection. Lors d'un suivi de la réponse CTL après l'interruption du traitement antirétroviral, il a été montré qu'il existe une association inverse entre la polyfonctionnalité des CTL et la valeur de la charge virale émergente (Daucher et al., 2008). A l'inverse, les CTL des patients virémiques présentent des niveaux faibles de Perforine (Trimble et Lieberman, 1998) (Appay et al., 2000), une faible capacité *ex vivo* à tuer les cellules infectées (Shankar et al., 2000) et une production défectueuse de cytokines (Goepfert et al., 2000) (Kostense et al., 2001).

Une étude plus récente (Almeida et al., 2009) a montré *in vitro* sur des clones CTL spécifiques de l'épitope KK10 (peptide de Gag) présenté dans le contexte du HLA-B27 que la

polyfonctionnalité et l'affinité fonctionnelle sont liées. En effet, dans cette étude, les CTL ayant une faible avidité fonctionnelle pour l'épitope présentent peu de fonctions antivirales.

Les études du rôle des CTL dans l'infection par le VIH ont été principalement effectuées chez des patients naïfs de traitement, ou à court terme après l'initiation d'un ART efficace. Ainsi, plusieurs études ont montré que chez des patients VIH recevant un traitement efficace, la fréquence des CTL spécifiques contre le VIH diminue (Ogg et al., 1999)(Kalams et al., 1999)(Casazza et al., 2001). Une étude plus récente (Rehr et al., 2008) chez des patients infectés chroniquement ayant suivi une thérapie antirétrovirale efficace, montre que les CTL après une médiane de 2,5 années de traitement antirétroviral récupèrent leur fonctionnalité.

Dans l'état actuel des connaissances, il apparaît que l'induction d'une réponse efficace peut être la clé de l'éradication du VIH chez les patients infectés. Des efforts importants ont permis d'élucider les caractéristiques nécessaires pour obtenir cette réponse. Actuellement, la recherche de stratégies vaccinales a comme objectif de trouver la manière d'induire une telle réponse *in vivo*.

E. Prise en charge thérapeutique du patient infecté

1. Les molécules antirétrovirales disponibles

En l'absence de traitement, le VIH est une maladie létale. Néanmoins, les progrès faits en recherche thérapeutique pendant la décennie 1996-2006 ont permis de réduire drastiquement les décès liés au SIDA. Désormais, l'infection VIH en France est classifiée comme une maladie chronique.

Malheureusement, le traitement actuel de l'infection ne permet pas l'éradication complète du virus, les objectifs thérapeutiques actuels sont d'empêcher la progression de la maladie vers la phase SIDA en restaurant le nombre de lymphocytes CD4⁺ à un taux supérieur à 500 cellules/mm³ et de rendre la charge virale plasmatique indétectable (<50 copies/ml).

La thérapie qui s'est avérée la plus efficace dans le contrôle de la charge virale consiste en l'association de trois molécules antirétrovirales agissant sur les enzymes indispensables à la réplication virale (RT, Protéase, Intégrase) ou empêchant l'entrée du virus dans la cellule cible. En 2010, il existe six classes médicamenteuses d'antirétroviraux disponibles:

- La classe des inhibiteurs nucléosidiques/nucléotidiques de la transcriptase inverse (INTI) est la première classe d'antirétroviraux mise sur le marché et constitue la base des trithérapies. Aujourd'hui, sept molécules antirétrovirales INTI sont disponibles en France (tableau I). Ce sont des analogues de structure des nucléosides naturels, pour être actifs, ils doivent subir une triphosphorylation intracellulaire. Leur mode d'action consiste à entrer en compétition avec les nucléosides naturels lors de la rétrotranscription de l'ARN en ADN viral. Les INTI ne comportent pas de groupement OH en position 3', ils agissent donc comme des terminateurs de chaîne et bloquent ainsi l'élongation.
- Les inhibiteurs non nucléosidiques de la transcriptase inverse (INNTI) contrairement aux INTI, n'agissent pas de façon compétitive. Ils se fixent directement à proximité du site catalytique de l'enzyme et bloquent son activité. Actuellement, il existe trois INNTI sur le marché (tableau I)
- Les inhibiteurs de protéase (IP) agissent pendant la phase de maturation des protéines virales. Les IP actuellement disponibles sont des peptidomimétiques, qui se lient compétitivement sur le site actif de la protéase. Cette inhibition conduit à la

production de nouveaux virions non infectieux. Plusieurs générations d'IP sont actuellement disponibles. Le Ritonavir, à l'origine utilisé comme inhibiteur de protéase, est aujourd'hui utilisé comme potentialisateur des autres inhibiteurs de protéases. En effet, il est capable d'augmenter leur durée de vie dans l'organisme. Actuellement, les inhibiteurs de protéase sont en France systématiquement prescrits avec le Ritonavir, on parle alors d'inhibiteur de protéase boosté.

- Les Inhibiteurs d'intégrase constituent une nouvelle classe d'antirétroviraux. Il s'agit de dérivés de diketo-acide capables de se fixer sur un des sites catalytiques de l'IN et d'inhiber l'étape de transfert de brin catalysée par celle-ci (Marchand et al., 2009). Le raltégravir (MK-0518 ou Isentress), développé par la firme Merck, est actuellement disponible en France (obtention de l'AMM le 20 octobre 2007).
- Les inhibiteurs du CCR5: Actuellement, il n'existe qu'une seule molécule disponible sur le marché, le Maraviroc, commercialisé sous le nom de Celsentri[®] par la société ViiV. Elle appartient à une nouvelle classe d'antirétroviraux, les antagonistes du CCR5, dont le mécanisme d'action est différent des autres antirétroviraux actuellement disponibles. Plutôt que de combattre le virus présent à l'intérieur des cellules cibles, les antagonistes CCR5 empêchent le virus de pénétrer dans la cellule en bloquant une de ses portes d'entrée: les corécepteurs CCR5.
- L'Inhibiteur de Fusion (IF) est un oligopeptide (T20 ou Enfuvirtide) qui possède une forte affinité pour la gp41 et bloque la fusion virus-membrane de la cellule hôte. Cette liaison inhibe le changement de configuration de la gp41 en faisceau de six hélices bloquant ainsi la juxtaposition des membranes et inhibant ainsi leur fusion (Kilby et al., 1998) (Fung et Guo, 2004). L'Enfuvirtide a obtenu l'AMM dans l'union européenne en Mars 2003.

Plus d'une vingtaine de molécules antirétrovirales sont actuellement disponibles sur le marché, ce grand nombre de molécules permet de répondre efficacement aux problèmes d'échec thérapeutique liés aux résistances.

La simplification de la thérapie, et notamment les combinaisons de molécules au sein d'un même comprimé (tableau I) est une grande avancée dans le traitement de l'infection, car cela a permis de diminuer le nombre de prises au cours de la journée et donc de rendre la

thérapie plus acceptable au patient.

Le progrès le plus remarquable fait ces dernières années dans le cadre du traitement VIH est d'avoir rendu accessible les antirétroviraux dans les pays à ressources limitées. Le chiffre de personnes ayant accès à un traitement antirétroviral en 2008 selon l'OMS et l'ONUSIDA était d'environ quatre millions de personnes, soit plus d'un million de personnes supplémentaires par rapport à la fin 2007, cela représente une multiplication par dix en cinq ans. La région ayant connu la plus forte hausse du nombre des patients traités est l'Afrique subsaharienne qui montre une multiplication par 30 depuis la fin des années 2003 (Rapport de situation OMS 2009)

2. Recommandations de prise en charge des personnes infectées par le VIH en 2010.

Les indications thérapeutiques françaises de 2010 pour la prise en charge de patients infectés par le VIH (Yeni, 2010) indiquent qu'un premier traitement antirétroviral doit permettre de rendre la charge virale indétectable au plus tard six mois après l'initiation du traitement. Pour atteindre cet objectif, une charge virale est réalisée un mois après le début du traitement où une diminution d'au moins 2Log doit être mesurée, et le seuil de moins de 50 copies/ml doit être atteint au troisième mois de suivi.

Avant de commencer tout traitement, un test génotypique de résistance doit être fait, ceci permet de connaître le sous-type viral et d'adapter le traitement en cas de souches virales déjà porteuses de mutations.

Pour un traitement de première ligne, les recommandations préconisent de commencer par une association de trois molécules, en suivant un des deux schémas «classiques»: soit deux INTI et un IP potentialisé par le Ritonavir, soit deux INTI et un INNTI. De nos jours, il est impossible de privilégier l'un ou l'autre schéma de première ligne. Une étude comparative (Riddler et al., 2008) montre qu'en termes de réduction de charge virale plasmatique, l'association de deux INTI + un INNTI (Efavirenz) est plus efficace que celle de deux INTI + un IP (Lopinavir). Cependant, pour la reconstitution du pool de lymphocytes CD4, les résultats sont inversés. De ce fait, aucun des deux schémas n'est privilégié. En pratique, le tableau II résume les recommandations pour la première ligne de traitement.

Son efficacité reste une étape critique pour l'avenir thérapeutique de chaque patient et doit

faire l'objet d'une attention particulière. Certains effets indésirables peuvent être graves ou responsables d'une mauvaise observance, ce qui induira l'échec thérapeutique. Le suivi doit donc se faire régulièrement et les consultations doivent être rapprochées pendant les premiers six mois.

Tableau I : Molécules antirétrovirales disponibles en 2010 (D'après :Yeni, 2010)

Nom Générique	Nom Commercial
Inhibiteurs Nucléosidiques/Nucléotidique de la Transcriptase Inverse	
Abacavir (ABC)	Ziagen
Emtricitabine (FTC)	Emtriva
Didanosine (ddl)	Videx
Lamivudine (3TC)	Epivir
Stavudine (d4T)	Zerit
Zidovudine (AZT)	Retrovir
Tenofovir (TDF)	Viread
AZT+ 3TC	Combivir
ABC +3TC	Kivexa
AZT+3TC+ABC	Trizivir
TDF+FTC	Truvada
Inhibiteurs Non Nucléosidiques de la Transcriptase Inverse	
Efavirenz	Sustiva
Névirapine	Viramune
Etravirine (TMC125)	Intelence.
Inhibiteurs de protéase	
Atazanavir (ATV)	Reyataz
Indinavir	Crixivan
Fosamprénavir (FPV)	Telzir
Lopinavir (LPV)/Ritonavir	Kaletra
Saquinavir	Invirase
Amprenavir	Agenerase
Darunavir	Prezista
Tipranavir	Aptivus
Inhibiteur de Fusion	
Enfuvirtide (T-20)	Fuzeon
Inhibiteur du CCR5	
Maraviroc	Celsentri
Inhibiteur de l'intégrase	
Raltégravir	Isentress

Tableau II: Recommandations 2010 pour la première ligne de traitement en France (D'après :Yeni, 2010)

Trithérapie avec INNTI		
INTI	INTI	INNTI
Ténofovir (1)	Emtricitabine	Efavirenz
Trithérapie avec IP		
INTI	INTI	IP
Ténofovir (1)	Emtricitabine	Atazanavir/r
		Darunavir / r
		Lopinavir/r
Trithérapie avec IP (alternative)		
INTI (2,3)	INTI	IP
Abacavir	Lamivudine	Atazanavir/r
		Lopinavir/r

(1) précaution en cas d'insuffisance rénale ; (2) uniquement si HLA B5701 négatif ; (3) uniquement si CV <100000 copies/ml

Les dix années de recul dans l'utilisation de la trithérapie antirétrovirale contre l'infection par le VIH ont permis d'avancer considérablement sur la mise au point des stratégies thérapeutiques chaque fois plus puissantes. Il reste toutefois un point de débat sur le moment optimal pour initier le traitement antirétroviral chez les patients chroniquement infectés. Pour répondre à cette question, les cliniciens doivent évaluer le rapport bénéfices/risques d'une exposition prolongée aux antirétroviraux et surtout évaluer la toxicité à long terme.

Pour tous les patients dépistés initialement au stade SIDA ou pour lesquels le taux des CD4 est inférieur à 350 cellules/mm³, le rapport bénéfices/risques est très favorable et il convient de commencer le traitement le plus rapidement possible.

En revanche, pour les autres patients asymptomatiques ayant un taux de CD4 supérieur à 350 cellules/mm³ la décision est difficile. Des arguments nouveaux, issus d'études de cohorte et d'essais thérapeutiques, plaident en faveur d'une meilleure reconstitution immunologique pour les patients initiant un traitement précoce (Moore et al., 2008) (Baker et al., 2008) .

Cependant, d'autres arguments plaident pour retarder le début du traitement, notamment la toxicité des antirétroviraux à long terme qui peut induire des problèmes de tolérance et avoir un impact sur l'observance thérapeutique. La fréquence des échecs thérapeutiques est en grande partie liée aux difficultés de prises au cours d'un long traitement quotidien, ce qui aboutit à une non observance thérapeutique.

Pour les patients asymptomatiques ayant un nombre de lymphocytes CD4 compris entre 350 et 500 CD4⁺/mm³ les recommandations française 2010 conseillent de débiter le traitement sauf si le patient exprime qu'il n'est pas prêt (Yeni, 2010).

Chez les patients asymptomatiques ayant un taux de CD4⁺ supérieur à 500 CD4⁺/mm³, le début du traitement peut s'envisager dans certaines circonstances, mais les données existantes ne permettent pas de fournir des recommandations précises et le choix doit être une décision commune prise entre le médecin et le patient (Yeni, 2010)

Une fois le traitement débuté et l'indéteçtabilité de la charge virale atteinte, des visites espacées d'environ trois mois sont effectuées pour réaliser un bilan immuno-virologique (évaluation de la charge virale plasmatique et le taux de lymphocytes CD4⁺), faire une analyse du traitement en cours et des résultats avec une éventuelle modification du traitement en tenant en compte des nouvelles combinaisons disponibles.

Une évaluation de la tolérance doit être effectuée au moins une fois par an, cliniquement (troubles digestifs, douleurs abdominales, signes cutanés, troubles neuropsychiques, neuropathie périphérique, colique néphrétique, lipodystrophie, cytopathie mitochondriale) et biologiquement (bilan hépatique, hémogramme, dosage plasmatique d'antirétroviraux ...)

Les défis pour les années à venir en terme de thérapeutique sont donc de poursuivre le développement de molécules encore plus efficaces contre la réplication virale tout en ayant une tolérance plus élevée, de rendre de plus en plus accessibles les molécules aux plus démunis, notamment à travers des politiques commerciales des entreprises pharmaceutiques ou par rétrocession des brevets.

F. Échecs thérapeutiques

L'échec thérapeutique recouvre des situations très différentes, selon qu'il s'agit d'un échec clinique dans le cadre d'une infection non contrôlée, un échec virologique ou un échec immunologique. Le nombre de cas d'échec thérapeutique est en constante diminution. L'augmentation du taux des succès est du d'une part à l'utilisation des schémas thérapeutiques simplifiés, qui améliorent la tolérance en favorisant ainsi l'observance et d'autre part à la disponibilité des molécules plus efficaces permettant de contourner les phénomènes de résistances. En France, par exemple, sur l'ensemble des patients traités depuis au moins six mois par une multithérapie, le pourcentage de patients dont la charge virale est inférieure à 500 copies/ml est passé de 52% en 1998 à 70% en 2002 et atteint 85% en 2006. En 2008, 92% des patients traités avaient une charge virale inférieure à 500 copies/ml dont 83% n'avaient pas de charge virale détectable (< 50 copies/ml)(Yeni, 2010)

L'échec clinique se caractérise par l'apparition des symptômes cliniques témoins de la progression de la maladie (symptômes liés au VIH, infections opportunistes, cancers); habituellement ce stade s'accompagne d'un effondrement du taux des lymphocytes CD4⁺ et d'une augmentation exponentielle de la charge virale, mais actuellement, il est peu fréquent chez des personnes ayant un suivi clinique régulier. Dans cette étude nous nous intéresserons plus spécifiquement aux deux autres formes d'échec thérapeutique.

1. Échec Virologique et résistance aux antirétroviraux

L'objectif d'un traitement antirétroviral est l'obtention et le maintien d'une charge virale plasmatique inférieure à 50 copies/ml. En cas d'échec thérapeutique, l'échec virologique est la situation la plus fréquemment rencontrée. Elle est définie comme toute valeur détectable de la charge virale plasmatique sous traitement, c'est à dire au dessus du seuil de détection. Au cours des dix dernières années, différents seuil de détection ont été utilisés (<400 copies/ml, 200 copies/ml,.....) actuellement le seuil est fixé à 50 copies/ml.

Il est important de distinguer l'échec virologique d'un «blip» de la charge virale, qui correspond à une virémie transitoire de faible amplitude (entre 50 et 1000 copies/ml), le prélèvement suivant effectué dans les meilleurs délais retrouve une charge virale inférieure à 50 copies/ml. Ce pic de charge virale transitoire n'a pas montré à ce jour de conséquences à

long terme sur le risque d'échec virologique ou immunologique.

Un échec virologique est donc confirmé lorsque deux prélèvements consécutifs présentent une charge virale supérieure au seuil de détection.

Il s'explique par une inhibition suboptimale de la réplication virale. Ce phénomène est la conséquence d'une concentration plasmatique des molécules antirétrovirales insuffisante, due soit à un défaut d'observance, soit à une posologie inadaptée, soit à des interactions pharmacologiques néfastes, qui conduisent à une reprise de la réplication virale.

Si l'échec virologique est prolongé, ceci peut induire un développement de la résistance vis à vis d'une ou de plusieurs molécules antirétrovirales.

Pour les patients qui débute un traitement, l'échec virologique est en général lié à un problème d'observance ou de posologie. Cependant, pour les patients multitraités chez lesquels les traitements ont été partiellement efficaces, la cause essentielle de l'échec virologique est la résistance cumulée du virus aux molécules antirétrovirales au cours du temps.

Les conséquences de l'échec virologique vont dépendre de plusieurs facteurs notamment du niveau de charge virale plasmatique et sa durée. Si l'échec virologique est prolongé sous pression du traitement antirétroviral, le risque de sélection des mutations de résistance devient important. De plus, si l'échec virologique persiste, ceci peut entraîner des conséquences immunologiques graves, l'effondrement du taux des lymphocytes CD4, et donc la survenue des infections opportunistes qui peuvent compromettre le pronostic vital.

a) Mécanismes de sélection et détection des résistances.

La variabilité génétique des rétrovirus et en particulier celle des VIH est très grande. Elle induit très rapidement l'apparition d'une quasi-espèce virale chez l'hôte infecté. En effet, la transcriptase inverse des rétrovirus, et plus particulièrement celle du VIH, est une enzyme capable d'introduire des erreurs lors de la reverse transcription de l'ARN en ADN (Roberts et al., 1988). Le taux d'erreur de la RT du VIH est de l'ordre d'une mutation pour 3000 nucléotides synthétisés, c'est-à-dire que pour chaque cycle de réplication, la reverse transcriptase peut introduire de deux à trois erreurs de transcription. Il a été estimé que chaque jour, environ 10 milliards de nouveaux virions sont générés chez la personne infectée

portant des mutations dans chaque région du génome. Ces mutations peuvent être neutres, sans effet sur la capacité répliquative du virus, elles peuvent s'avérer néfastes pour les virus, dans ce cas le nouveau virion généré sera incapable de se répliquer, ou elles peuvent donner un avantage répliquatif au virus. Cette variabilité permet au virus de s'adapter très rapidement aux conditions de l'environnement. La résistance aux antirétroviraux apparaît donc après la sélection d'une quasi-espèce virale comportant des mutations spécifiques au sein des protéines cibles, ce qui diminue la sensibilité de cette souche virale à l'ARV considéré. Les mécanismes d'acquisition des résistances sont différents et dépendent du mode d'action de la molécule:

- Pour les molécules appartenant à la classe des analogues nucléosidiques, deux mécanismes ont été identifiés comme responsables de la résistance.

Le premier correspond à la diminution de l'incorporation des nucléosides artificiels au profit de nucléosides naturels. C'est le cas de la mutation M184V associée à la résistance de haut niveau au 3TC et au FTC (Boucher et al., 1993) ; dans ce cas la substitution d'une Valine à une Méthionine dans le site catalytique de la reverse transcriptase entraîne une gêne stérique pour l'analogue nucléosidique 3TC ou FTC au profit du nucléoside naturel (Schuurman et al., 1995). Ce mécanisme est décrit aussi pour la mutation Q151M et son complexe (A62V, V75I, F77L, F116Y), ainsi que pour les mutations L74V, K65R et K70E.

Le deuxième mécanisme impliqué dans les résistances aux INTI est l'excision de l'analogue nucléosidique déjà incorporé. Cette résistance est conférée par les mutations appelées TAM (Thymidine Analogue Mutation). Les TAM modifient la structure de la RT, facilitant l'entrée de l'ATP au niveau d'un site proche de l'analogue incorporé à l'ADN. Le Pyrophosphate de l'ATP réagit avec la liaison phosphodiester liant l'analogue nucléosidique et le détache de la chaîne ADN. Une fois le terminateur de chaîne extrait, la synthèse de l'ADN peut reprendre. Ces mutations sont sélectionnées par les analogues de la Thymidine (Zidovudine, Stavudine) et correspondent aux mutations M41L, D67N, K70R, L210W, T215Y/F et K219Q/E (Naeger et al., 2002).

La barrière génétique du virus, c'est-à-dire le nombre de mutations nécessaires pour que le virus devienne résistant à une molécule, est très variable selon les molécules;

elle est en particulier très faible pour la Lamivudine et l'Emtricitabine (une seule mutation suffit).

- Les inhibiteurs non nucléosidiques de la Transcriptase Inverse sont des molécules qui se fixent à proximité du site catalytique de l'enzyme. Une seule mutation au niveau de leur site de fixation peut induire une résistance de haut niveau à l'INNTI, ce sont des molécules dont la barrière génétique est basse. Ces mutations entraînent une résistance croisée entre toutes les molécules de la première génération de la classe INNTI, il est donc recommandé de ne pas laisser se prolonger une réplication résiduelle sous Efavirenz ou Névirapine, qui entraîne rapidement l'accumulation de mutations de résistance aux INNTI (de Béthune, 2010).
- La résistance associée aux inhibiteurs de protéases est un phénomène graduel avec accumulation progressive de mutations (Molla et al., 1996). On distingue deux types de mutations de résistance, les primaires, situées directement au niveau des sites de fixation et qui diminuent fortement la liaison de l'inhibiteur à la protéase, et les mutations de résistance mineurs pouvant faire partie des polymorphismes génétiques de la protéase virale ou qui apparaissent plus tardivement. L'addition de ces différentes mutations peut augmenter la résistance ou rétablir la capacité répliquative du virus. Il a été montré que les inhibiteurs de protéase boostés par le Ritonavir, possèdent une demi-vie augmentée dans l'organisme et donc sélectionnent moins de mutants de résistance que les inhibiteurs de protéase seuls. C'est pour cela que dans le cas d'un premier traitement avec un IP, il est recommandé de prescrire un IP potentialisé pour éviter la sélection de mutants résistants.
- La résistance à l'Enfuvirtide: l'inhibiteur de fusion sélectionne rapidement des mutations de résistance au niveau des acides aminés 36 à 45 de la gp41. Elles apparaissent en quelques semaines en cas de réplication sous Enfuvirtide. Plus tardivement, d'autres mutations sont à leur tour sélectionnées, elles ne semblent pas jouer un rôle dans la résistance à l'Enfuvirtide mais elles compensent la capacité répliquative des mutations primaires.
- Le Raltégravir, inhibiteur d'intégrase, a été mis sur le marché en 2007. Jusqu'à présent, deux grands profils de résistance ont été identifiés, soit la mutation N155H,

soit la mutation Q148K/R/H, associées à une ou plusieurs mutations secondaires. Cette molécule a une barrière génétique faible, il convient donc de n'autoriser aucune réplication résiduelle sous traitement comportant un inhibiteur d'intégrase.

Dans la pratique clinique, les tests génotypiques permettent d'analyser les mutations présentes dans les gènes des protéines cibles. La technique de référence est la PCR du gène codant pour les protéines (RT, protéase, intégrase, gp41) suivi d'une migration électrophorétique sur séquenceur automatique. Il faut souligner que cette technique, actuellement utilisée en clinique, ne permet d'analyser que la population virale majoritaire représentant au moins 20% de la population virale circulante dans le plasma. L'interprétation des tests génotypiques se fait grâce à des algorithmes «cliniquement validés», qui associent les mutations rencontrées aux résistances décrites. Pour la France l'algorithme de référence est celui de l'ANRS (AC 11).

b) Focus sur la mutation de résistance à la Lamivudine M184V de la RT

Même si la mutation M184V confère une forte résistance à la Lamivudine, d'autres effets ont été décrits tels que la diminution de la capacité répliquative, l'augmentation de la fidélité de la RT, le retard dans l'émergence des nouvelles mutations de résistance, l'augmentation de l'immunogénicité de l'hôte contre le virus qui peuvent apporter des bénéfices cliniques.

(1) Émergence de la mutation

La mutation M184V est une mutation de substitution ponctuelle dans le motif YMDD fortement conservé pour toutes les transcriptases inverses des rétrovirus. Elle confère une perte de sensibilité à la Lamivudine (inhibiteur nucléosidique de la reverse transcriptase) d'un facteur 100 à 1000 fois par rapport aux virus sauvages. Elle a été observée pour presque la totalité des patients traités par la Lamivudine chez lesquels il existe une réplication virale (Figure 10).

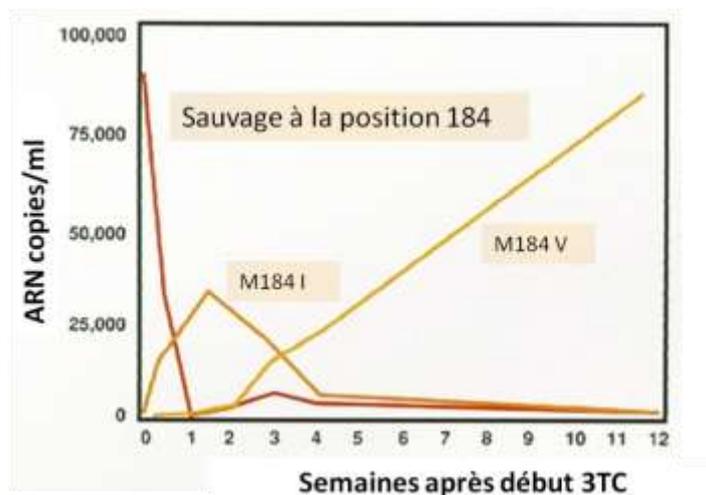


Figure 10: Charge virale et identification des virus mutés chez des patients traités par monothérapie de Lamivudine (3TC).

A partir de www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br. Adapté de Schuurman et al. 1995.

Pour des patients ayant été traités par monothérapie sous 3TC, la mutation apparaît dans les deux mois qui suivent l'initiation du traitement (Kuritzkes et al., 1996). Des études ont aussi montré que dans les trithérapies incluant deux INTI (dont la Lamivudine) et un IP, la première mutation à émerger est la M184V (Descamps et al., 2000). Pour les régimes incluant un INNTI, les mutations associées à la résistance aux INNTI et la M184V apparaissent en premier (Miller et al., 2002). Par conséquent il est généralement admis que chez des patients ayant une charge virale détectable sous un traitement contenant la Lamivudine, la mutation M184V est présente.

La Lamivudine est la seule molécule de la classe des inhibiteurs nucléosidiques de la reverse transcriptase pour laquelle une population virale ayant une mutation ponctuelle suffit pour développer une résistance totale.

(2) **Fitness du virus M184V.**

Le «fitness» est défini comme l'aptitude d'un virus à s'adapter à son environnement en termes de capacité répliquative. Il a été montré *in vitro* (Back et al., 1996), (Sharma et Crumacker, 1999), (Sharma et al., 2009) et par des études cliniques (Eron, 1996), que les souches VIH contenant la mutation M184V au sein de leur reverse transcriptase ont une diminution de la capacité répliquative et une augmentation de la fidélité de l'enzyme.

En effet, chez les patients infectés par une population virale majoritaire 184V, on observe

une rapide réversion de la mutation M184V (Brenner et al., 2002) (Cane, 2005)

De plus, les études AVANTI 2 et AVANTI 3, la présence de la mutation M184V était corrélée avec une charge virale basse par rapport aux patients sans mutation détectée (Maguire et al., 2000).

Une étude plus récente portant sur 7994 patients analysés avant le début du traitement a montré que parmi les 709 patients porteurs de différentes mutations de résistance transmises, seule la présence de la mutation M184V est corrélée avec une diminution de la charge virale plasmatique (différence de 0,33log copies/ml par rapport aux patients infectés par une population virale sauvage). Ceci implique que la mutation M184V apporte une perte de fitness se reflétant par la valeur plus faible de la charge virale plasmatique chez les patients porteurs de la mutation (Harrison et al., 2010)

(3) La mutation M184V augmente la fidélité de la RT

Différentes études cliniques (AVANTI, ALBI) suggèrent que la présence de la mutation M184V, est corrélée avec une réduction de l'émergence des résistances liées aux autres molécules. Par exemple, une étude rétrospective (Ait-Khaled et al., 2002), chez des patients traités par 3TC+ ABC+ZDV a montré que la proportion de patients en échec pour lesquels on identifie des virus contenant au moins trois TAM (Thymidine Analog Mutation) est significativement inférieur chez ceux préalablement traités avec la 3TC (9%) en comparaison des patients n'ayant jamais reçu de 3TC (36%).

Des expériences *in vitro* ont montré que la reverse transcriptase portant la mutation M184V introduit moins d'erreurs lors de la synthèse de l'ADN à partir de l'ARN virale que la RT sauvage (Wainberg et al., 1996) (Hsu et al., 1997). Ceci pourrait avoir comme conséquence une diminution de la diversité génétique et pourrait ainsi expliquer le retard de l'émergence des mutations contre les autres molécules du traitement.

Pour ces raisons, exposées dans les paragraphes (2) et (3), il a été suggéré que la 3TC ou le FTC soient maintenus au sein d'une association de molécules même après apparition de la mutation M184V (Turner et al., 2004) .

(4) Réponse immune contre le virus porteur de la mutation M184V

Une question qui s'est largement posée est celle de l'effet de la mutation M184V sur la réponse immune de l'hôte (Petrella et Wainberg, 2002). En effet, il a été suggéré que la diminution de variation génétique entraîne une diminution de la variabilité dans le gène de l'enveloppe et que l'échappement aux anticorps neutralisants spécifiques du VIH émerge alors moins vite (Inouye et al., 1998).

Par ailleurs, les conséquences de la mutation M184V sur la reconnaissance des lymphocytes cytotoxiques sont peu connues. Une étude sur les lignées CTL spécifiques du VIH, suggère que la RT porteuse d'une mutation M184V serait au moins aussi immunogène que la RT sauvage (Samri et al., 2000). Cependant, cette observation a été faite sur une seule lignée CTL issue d'un patient, elle ne permet pas de savoir si cette reconnaissance est fréquente *in vivo* chez les patients en échec virologique et quel est l'impact de la réponse spécifique sur la réplication virale.

Ceci nécessite une analyse plus approfondie sur plus de données, c'est pourquoi nous avons choisi d'explorer dans nos travaux la réponse CTL spécifique d'un épitope de la reverse transcriptase porteuse de la mutation M184V.

2. Échec Immunologique.

a) Définition et causes de l'échec immunologique

Une autre situation d'échec pouvant se présenter pendant le traitement de l'infection par le VIH est celle de l'échec immunologique, défini par l'absence de reconstitution du compartiment des lymphocytes CD4⁺ malgré un traitement antirétroviral efficace depuis au moins six mois (Piketty et al., 1998). Cet échec est observé chez 5%-27% des patients traités ayant une charge virale plasmatique indétectable (David et al., 2001). En 2009, une étude rétrospective sur 366 patients traités ayant une charge virale inférieure à 1000 copies/ml pendant au moins quatre ans, a montré que les patients qui commencent leur thérapie antirétrovirale avec un taux de CD4 inférieur à 200 cellules/mm³ ont une probabilité importante de ne jamais atteindre une restauration complète du compartiment CD4 (Kelley et al., 2009). Les causes pouvant expliquer ce phénomène ne sont pas complètement établies, mais plusieurs facteurs peuvent être impliqués.

Une étude (Benveniste et al., 2005) a montré que les lymphocytes T des patients en échec immunologique expriment des niveaux plus élevés de marqueurs d'activation (CD38⁺, HLA-DR⁺) et présentent une augmentation du taux d'apoptose spontanée et induite par rapport aux patients en succès thérapeutique. Certaines observations chez ces patients en échec immunologique pourraient faire penser que l'activation immunitaire entraîne une augmentation aberrante de l'apoptose (Sousa et al., 2002) (Grossman et al., 2002) (Gougeon, 2003) (Benito et al., 2005). Cependant, établir une relation de causalité entre l'apoptose et l'activation des cellules immunitaires reste difficile.

D'autre part, chez les patients en échec immunologique, la sous-population des lymphocytes T CD4⁺ naïfs (CD45RA⁺, CD62L⁺) est fortement atteinte. Il semble que pour ces patients la thymopoïèse soit compromise (Teixeira et al., 2001) ce qui peut empêcher le renouvellement correct du compartiment CD4.

Ainsi, différents facteurs immunologiques semblent jouer un rôle dans le défaut de restauration des lymphocytes CD4⁺ chez les patients en échec immunologique; cependant, leur interrelation n'a pas été établie. Il a été suggéré que la réplication virale persistante dans les tissus réservoirs serait à l'origine de l'hyperactivation chronique du système immunitaire et de l'épuisement thymique (Ostrowski et al., 2005) (Mavigner et al., 2009) générant ainsi un défaut de restauration du compartiment CD4⁺.

Par ailleurs, il a été montré que le taux de translocation microbienne (mesuré en quantité de 16Sr ADN et LPS plasmatique) est inversement corrélé au taux de récupération des lymphocytes T CD4⁺ chez les patients VIH⁺ traités, et ceci indépendamment de l'évolution de la valeur de la charge virale plasmatique (Jiang et al., 2009). Il est probable que chez ces patients, la présence microbienne persistante soit un des facteurs contribuant à l'échec immunologique. Un cercle vicieux pourrait alors s'installer (Figure 11): Lors de la primo-infection le système immunitaire de la muqueuse du tractus gastro-intestinale (GALT) fortement atteint (Brenchley et al., 2004) permet l'infection bactérienne et la translocation de celle-ci; la translocation bactérienne induit à son tour une activation chronique du système immunitaire (Brenchley et al., 2006), augmentant le nombre de cellules cibles du VIH et compromettant sa reconstitution, à son tour, cette faible reconstitution de la population T CD4⁺ de la muqueuse gastro-intestinale (Mehandru et al., 2006) (Guadalupe et al., 2006) conduit alors à un dysfonctionnement de la barrière de la muqueuse et donc à l'entretien de la translocation bactérienne. Ce modèle expliquant l'échec immunologique, semble cohérent; en effet, chez le modèle SIV pathogène du macaque, on retrouve des niveaux de translocation bactérienne anormalement élevés, ce qui n'est pas le cas dans le modèle SIV non pathogène du Sooty Mangabey (Brenchley et al., 2006).

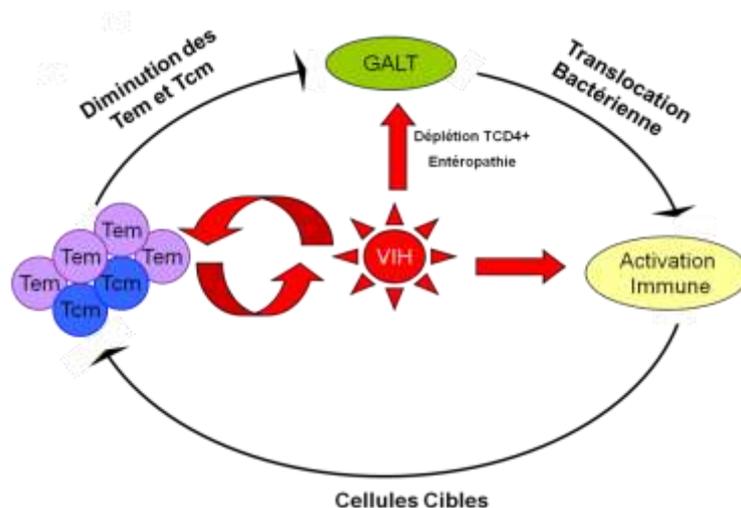


Figure 11: Cercle vicieux établie durant la primo-infection du VIH dans la muqueuse gastro-intestinale

Adapté de : (Paiardini et al., 2009)

b) Approche thérapeutique pour traiter l'échec immunologique: la famille des cytokines γ c.

Un déficit immunitaire soutenu pendant plusieurs années a des graves conséquences cliniques avec la survenue d'infections opportunistes ou le développement de cancers (figure 12).

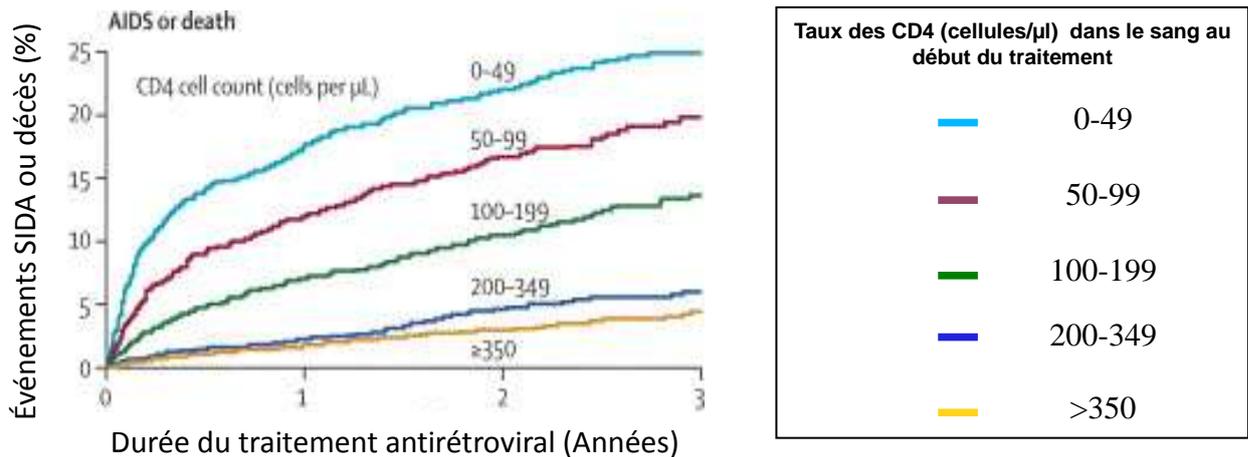


Figure 12: Relation entre le taux de CD4 des patients au moment de l'initiation du ART et les événements SIDA ou le décès.

D'après : (Egger et al., 2002)

Il est nécessaire d'envisager des nouvelles approches thérapeutiques qui, en combinaison avec l'ART, puissent induire une reconstitution et un maintien du taux des CD4 à un niveau physiologiquement normal.

Comme les cytokines de la chaîne γ commune jouent un rôle essentiel dans la prolifération, l'apoptose et le maintien des lymphocytes (Boyman et al., 2007) (Surh et Sprent, 2008), elles ont été prises en considération, comme possibles candidates pour un traitement adjuvant.

La famille des cytokines γ c comprend l'interleukine-2 (IL-2), IL-4, IL-7, IL-9, IL-15 et IL-21. Les récepteurs de ces différentes interleukines partagent la chaîne γ commune (figure 13).

Dans le cadre de l'infection par le VIH, les interleukines les plus étudiées et sur lesquelles nous nous sommes particulièrement focalisées sont l'IL-2, l'IL-7 et l'IL-15.

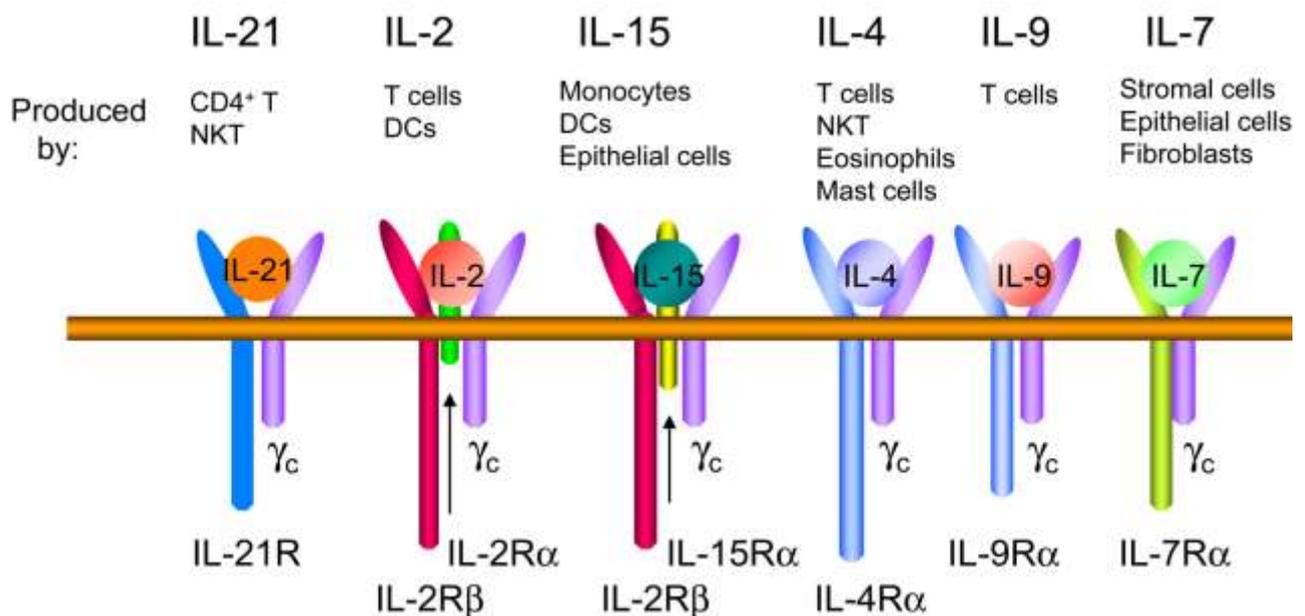


Figure 13: Interleukines de la famille de la chaîne γ commune et leurs récepteurs

D'après (Rochman et al., 2009)

(1) L'Interleukine 2 et le traitement du VIH

L'Interleukine-2 joue un rôle crucial dans la régulation de l'immunité cellulaire et humorale. Elle stimule l'activation et la prolifération des cellules T CD4⁺ et CD8⁺, l'activité cytotoxique des cellules T et elle induit la différenciation des lymphocytes B en cellules productrices d'immunoglobulines. Une fonction essentielle de l'IL-2 est de maintenir l'homéostasie et la capacité proliférative de la population des lymphocytes T CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ (ou Treg) (Fontenot et Rudensky, 2005), impliqués dans la tolérance du soi. Les lymphocytes Treg ont également un rôle immunosuppresseur contrôlant la phase de contraction permettant au système immunitaire de revenir à un niveau basal après une réponse immune (Ostroukhova et al., 2006).

Le récepteur de l'interleukine-2 est un trimère composé de trois chaînes α , β et γ (figure 13), L'IL-2 se fixe aux chaînes $\beta\gamma$ du récepteur avec une affinité moyenne, alors que le trimère $\alpha\beta\gamma$ possède une forte affinité pour l'IL-2.

L'IL-2 a été la première interleukine envisagée comme traitement de l'infection par le VIH. En

1982, A.H Rook et collègues ont montré *in vitro* que l'activité spécifique contre le CMV des cellules NK et des lymphocytes T des patients ayant un Sida, pouvait être restaurée en présence de l'IL-2, cette molécule a donc été proposée comme un moyen efficace pour lutter contre les infections opportunistes tel que le CMV (Rook et al., 1983).

Depuis plus de 20 ans, plus de 5000 patients infectés par le VIH ont été traités par l'IL-2 dans le cadre d'essais randomisés de phase II et phase III.

Les premiers essais cliniques (entre 1986-1995) ont montré que l'administration de l'IL-2 par cures espacées de 2 mois permettait d'augmenter de manière significative les lymphocytes T CD4⁺ chez des patients traités par des antirétroviraux (monothérapie ou bithérapie)(Kovacs et al., 1995)(Kovacs et al., 1996). Pendant cette phase préliminaire, le principal problème fut l'apparition des effets secondaires (troubles digestifs, fièvre, douleurs musculaires) et il est apparu une inquiétude liée au risque d'augmenter la réplication du virus par l'IL-2.

Entre 1995-1999, ces inquiétudes ont été levées grâce à différents essais qui ont évalué la dose adéquate d'IL-2 permettant d'éviter sa toxicité (Hengge et al., 1998) (Arnó et al., 1999)(Davey et al., 1999) (Levy et al., 1999) (Simonelli et al., 1999). De plus, l'utilisation de trithérapies antirétrovirales a écarté le risque de multiplication virale sous IL-2.

Entre 1999 et 2007, différents essais cliniques ont montré que l'IL-2 administrée avec une trithérapie efficace permettait une augmentation persistante dans le temps des niveaux des lymphocytes CD4 dans le sang (Katlama et al., 2002) (Levy et al., 2003) (Arduino et al., 2004).

Cependant, avant 2009, même si les effets de l'IL-2 sur le gain de lymphocytes T CD4 sont confirmés, il n'existe aucune donnée sur les bénéfices cliniques apportés par l'IL-2. Pour répondre à cette question, deux grands essais cliniques ont été conçus, l'essai SILCAAT comportant 4000 patients ayant moins de 300 lymphocytes par mm³ et l'essai ESPRIT comportant 1695 patients ayant plus de 300 lymphocytes /mm³. La conclusion de ces études confirme que le traitement par l'IL-2 est corrélé avec une augmentation durable du nombre de lymphocytes CD4⁺. Cependant, aucun bénéfice clinique (en terme de survenu de maladies opportunistes et décès) pour les patients recevant l'IL-2 en traitement adjuvant par rapport aux patients recevant une trithérapie seule n'a été mis en évidence. Pour expliquer ces résultats surprenants et décevants plusieurs hypothèses ont été avancées.

En premier lieu, il est probable que la sous-population des lymphocytes qui prolifère, suite à

l'administration de l'IL-2, ne joue aucun rôle dans la réponse immunologique de l'hôte. Une autre explication possible est l'équilibre existant entre les bénéfices de l'IL-2 sur le taux de T CD4⁺ et les effets cliniques négatifs induits par l'administration de l'IL-2 (Abrams et al., 2009). Très récemment, une étude effectuée chez 31 patients ayant reçu au moins trois cycles d'IL-2 en plus du traitement antirétroviral classique, a montré que l'IL-2 induit une augmentation du taux des lymphocytes CD4 présentant un phénotype : CD4⁺ CD25⁺. Ces sous-populations CD4 expriment Foxp3⁺ et sont dotées des caractéristiques immunosuppressives similaires à celles des Treg (Weiss et al., 2010). Ces observations pourraient expliquer les résultats décevants de l'IL-2 en termes de reconstitution immunologique.

(2) **L'Interleukine-7 et le traitement du VIH**

L'interleukine-7 est une cytokine sécrétée par les cellules stromales de la moelle osseuse, les cellules de l'épithélium thymique, ainsi que les cellules reticulaires fibroblastiques des organes lymphoïdes (Link et al., 2007). Elle joue un rôle central dans la production thymique, mais aussi dans l'homéostasie lymphocytaire T CD4⁺ et CD8⁺ périphériques. Le récepteur de l'IL-7 est un dimère composé par une chaîne α et la chaîne γ commune (figure 13).

Les principales cellules cibles de l'IL-7 sont les lymphocytes naïfs (Tan et al., 2001) (Seki et al., 2007) (Sportès et al., 2008) bien que l'IL-7 induise également la prolifération des LT CD8⁺ et LT CD4⁺ mémoires (Osborne et Abraham, 2010).

Le fait que l'IL-7 stimule les LTCD4⁺ naïfs et mémoires, donne à cette molécule un potentiel thérapeutique majeur, qui est exploré actuellement. En effet, en comparaison avec l'IL-2, l'IL-7 semble pouvoir augmenter le taux des CD4⁺ au sein des sous-populations CD4⁺ les plus déplétées lors de la pathologie VIH (Dunham et al., 2008)

Les études précliniques dans le cadre de l'infection par le SIV chez le macaque montrent une forte augmentation du taux des LTCD4⁺ Naïfs (Nugeyre et al., 2003) (Fry et al., 2003) (Beq et al., 2006) ce qui a permis de mettre en place des essais cliniques chez l'Homme. Ces études ont démontré l'efficacité en termes de reconstitution du taux des LTCD4⁺ et de tolérance clinique (Sereti et al., 2009). L'augmentation du nombre de LTCD4⁺ est durable jusqu'à 48 semaines après l'arrêt de l'IL-7 (Levy et al., 2009).

Malgré ces résultats encourageants, l'idée d'utiliser cette molécule en traitement adjuvant pour la restauration du compartiment CD4 reste encore discutée. Plusieurs questions se

posent sur le rôle de l'IL-7 au cours de l'infection par le VIH.

- En effet, le niveau d'IL-7 dans le sérum des patients est plus élevé que chez des donneurs sains et il a été observé que le niveau élevé d'IL-7 dans le sérum des patients corrèle avec une déplétion des CD4 et une évolution plus avancée de la maladie (Llano et al., 2001)(Napolitano et al., 2001). Ces observations vont contre l'utilisation thérapeutique d'IL-7. Cependant, l'utilisation d'une dose très élevée d'IL-7 comme celles utilisées lors des essais cliniques semblent avoir des effets bénéfiques.
- De plus, plusieurs études ont observé une «down-régulation » de l'expression du récepteur IL7R sur les lymphocytes des patients infectés (Rethi et al., 2005)(Koesters et al., 2006)(Benito et al., 2008)(Bazdar et al., 2009) , d'autres études suggèrent un dysfonctionnement dans la voie de signalisation activée par l'IL-7 (Colle et al., 2007)(Bazdar et al. 2009) (Camargo et al. 2009) (Juffroy et al., 2010). Si la réponse fonctionnelle à l'IL-7 est défectueuse chez les patients VIH⁺, il pourrait y avoir des conséquences pour l'efficacité d'une thérapie adjuvante par l'IL-7

Malgré les arguments théoriques contre l'utilisation de l'IL-7 en thérapeutique, les premiers essais cliniques encourageants placent aujourd'hui l'IL-7 comme le candidat principal pour une immunothérapie en combinaison avec le traitement antirétroviral. Des études cliniques comme celles effectuées pour l'IL-2 sont nécessaires pour évaluer les réels bénéfices de cette thérapie.

(3) L'Interleukine -15 et traitement du VIH.

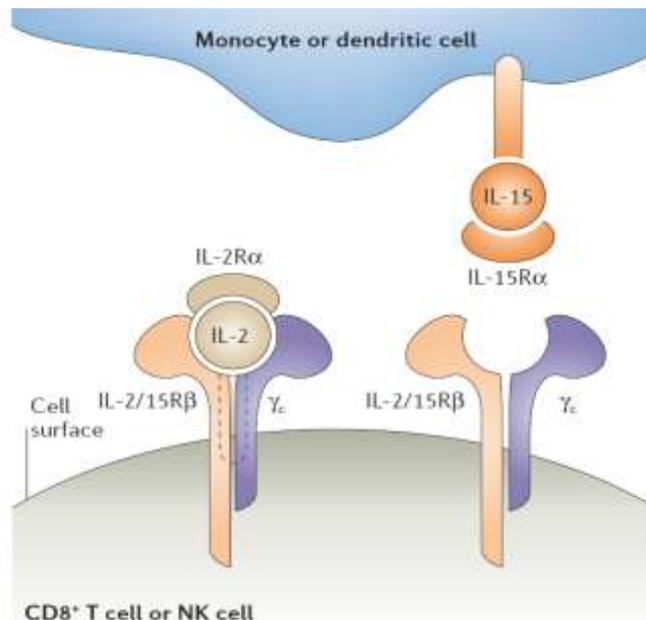


Figure 14: La transprésentation de l'IL-15

D'après: (Waldmann, 2006)

L'IL 15 est une cytokine exprimée principalement par les macrophages et les monocytes. D'autres cellules ont été aussi impliquées dans la sécrétion de l'IL-15 telles que les cellules dendritiques et les cellules stromales de la moelle osseuse. L'IL-15 partage avec l'IL-2 un récepteur hétéro-dimérique associant la chaîne β et la chaîne γ (figure 14). Elles forment un récepteur d'affinité intermédiaire et la présence de ses deux chaînes est suffisante à la transduction du signal induit par l'IL-15. La chaîne α , propre au récepteur de l'IL-15, se trimérise avec les chaînes β et γ , et forme un récepteur de forte affinité pour l'IL-15 (Waldmann, 2006). De plus la chaîne α du récepteur de l'IL-15 (IL-15R α) est capable seule de fixer l'IL-15 avec une forte affinité ($K_d = 100\text{pM}$). Cette forte affinité qui lie l'IL-15 et l'IL-15R α permet aux cellules qui expriment les deux protéines simultanément (cellules dendritiques ou monocytes) de les présenter en surface sous la forme d'un complexe IL-15/IL-15R α . Ce complexe porté par une cellule présentatrice d'antigène est capable d'interagir avec le récepteur dimérique $\beta \gamma$ exprimé sur la membrane de la cellule cible et donc d'induire la signalisation. On parle d'une transprésentation de l'IL-15 qui confère une singularité propre à l'IL-15 (figure 14).

Différents rôles ont été décrits pour l'IL-15 sur les cellules du système immunitaire. Elle est impliquée principalement dans le développement des cellules NK (Kennedy et al., 2000). Elle

assure la différenciation de ces cellules NK en cellules effectrices ayant des fonctions cytotoxiques capables de moduler la réponse innée contre les infections virales (Mrózek et al., 1996) (Flamand et al., 1996) (Atedzoe et al., 1997). Concernant les lymphocytes T, il a été prouvé *in vitro* que l'IL-15 stimule la prolifération préférentiellement des LT CD8⁺, naïfs et mémoires. Sur les LT CD4⁺, elle n'exercerait un rôle prolifératif et anti-apoptotique que sur les cellules mémoires (CD45RA⁻). En effet, peu d'effets ont été constatés sur les lymphocytes CD4⁺ naïfs (CD45RA⁺) (Kanegane et Tosato, 1996).

Dans le cadre de l'infection par le VIH, les premières études ont montré qu'*in vitro* l'IL-15 restaure la production de l'IL-12 par les PBMC des patients VIH⁺ (Chehimi et al., 1997) sans augmenter la réplication virale. Ces observations suggèrent alors que l'IL-15 pourrait jouer le rôle d'un immunorégulateur durant l'infection par le VIH. De plus, le fait que l'IL-15 augmente la réponse cytotoxique antivirale en induisant la prolifération des CTL (Mueller et al., 2003) et la différenciation de NK, a conduit à émettre l'hypothèse selon laquelle l'administration de la molécule en phase aiguë de l'infection permettrait un meilleur contrôle de la réplication virale à la primo-infection.

Les premières études dans le modèle macaque infecté par le SIV en phase chronique (Mueller et al., 2005) montrent une augmentation significative des CD8 et NK chez les macaques traités, cependant, aucun effet sur la valeur de charge virale n'a été constaté. Des études postérieures sur des macaques traités en primo-infection ont été décevants car ils ont montré que le traitement en phase aiguë par l'IL15 chez les macaques infectés par le SIV augmente la valeur du « Set point » et accélère la progression de la maladie (Mueller et al., 2008). Ceci remet en cause l'utilisation de l'IL-15 comme traitement de la maladie par le VIH. Il est probable que les effets néfastes observés lors du traitement de l'IL-15 en phase aiguë de la maladie soient dû à une augmentation du nombre des cellules cibles du virus (CD4 mémoire) induite par la cytokine.

Désormais, il est clair que l'IL-15 ne pourra pas être utilisée en phase aiguë de l'infection. Mais, il n'est pas exclu que chez les patients ayant une réplication virale plasmatique contrôlée, les effets immunostimulateurs puissent être bénéfiques. Dans ce cadre, une étude a démontré que sur les cellules des patients VIH⁺ recevant un traitement HAART, l'IL-15 est capable d'augmenter la réponse contre les infections opportunistes (dans ce cas le CMV) d'une manière plus efficace que l'IL-2 (Patterson et al., 2008).

En conclusion, les cytokines de la famille de la chaîne γ commune peuvent être la clé pour la reconstitution complète du compartiment $CD4^+$. Cependant, il faut analyser leur propriétés et leurs effets sur les populations de lymphocytes T naïfs et mémoires pour évaluer à quel point elles pourraient compléter la trithérapie antirétroviral en tant qu'agents immunothérapeutiques de l'infection par le VIH. C'est pourquoi, lors du deuxième projet expérimental nous nous sommes intéressés particulièrement aux effets *in vitro* de l'IL-7 et l'IL-15 sur les PBMC des patients VIH⁺

**III. Réponse cytotoxique contre l'épitope
181-189 de la Transcriptase Inverse (RT) du
VIH chez des patients en échec virologique
sous 3TC**

A. Objectifs

Plusieurs études montrent que la réponse CTL diminue chez les patients traités (Kalams et al., 1999) (Ogg et al., 1999)(Spiegel et al., 1999) (Casazza et al., 2001) (Zhang et al., 2006). Néanmoins, des réponses CTL sont encore détectables après suppression de la charge virale dans le sang périphérique (Gamberg et al., 2004), et plus récemment il a été montré qu'après une durée prolongée sous ART, les CTL sont capables de récupérer leurs fonctions effectrices (Rehr et al., 2008).

Des questions peuvent alors être posées sur la capacité de la réponse CTL à limiter les échecs virologiques au cours de l'évolution de la maladie chez les patients traités.

Par ailleurs, le fait que plusieurs mutations de résistance soient localisées au sein des épitopes CTL (Samri et al., 2000) (Schmitt et al., 2000) (Mason et al., 2004) (Mahnke et Clifford, 2006) suggère que la réponse immune pourrait exercer une pression de sélection contre les virus résistants aux antirétroviraux. Mais peu de données existent sur la réponse immunitaire dirigée contre des épitopes contenant les mutations de résistance chez les patients en échec virologique.

Afin d'étudier cette question, nous nous sommes intéressés à la réponse CTL dirigée contre les épitopes contenant la mutation M184V, responsable de la résistance à la Lamivudine (3TC). Le choix d'étudier plus particulièrement la mutation M184V, est basé sur quatre considérations. Tout d'abord, la 3TC, qui fait partie des INTI, sélectionne très rapidement la mutation M184V. Il y a donc une très forte concordance entre l'échec virologique chez un patient suivant un traitement comportant la 3TC et la présence de la mutation M184V (Figure 10). C'est un cas unique parmi les INTI, car pour toutes les autres molécules de cette classe une accumulation de plusieurs mutations est nécessaire pour conférer la résistance. De plus, cette mutation confère au virus une perte importante de fitness, de ce fait les patients naïfs de traitement n'ayant pas la pression de sélection apportée par la 3TC, ne présentent pas de mutation au niveau de ce codon. Par ailleurs, la 3TC est une molécule peu toxique ayant une bonne tolérance clinique. Elle est donc fréquemment prescrite dans les thérapies combinées de première ligne (tableau II). Enfin, la mutation M184V se situe dans un épitope à restriction HLA-A2 (Harrer et al. 1996) (Samri et al. 2000), qui est l'allèle du HLA

le plus fréquent dans la population.

L'objectif de notre étude est d'évaluer la fréquence et l'intensité de la réponse CTL contre les épitopes de la RT contenant la mutation M184V, chez deux groupes de patients séropositifs HLA-A2⁺. Les patients naïfs de traitements ou « N », n'ayant jamais reçu de traitement antirétroviral, et les patients « 3TC », se trouvant en échec virologique sous 3TC. La relation existant entre l'intensité et la spécificité de cette réponse vis-à-vis de la mutation M184V, et les données clinico-biologiques des patients ont ensuite été analysées.

Cette étude fait l'objet d'un article soumis a *Journal of clinical Immunology* (Annexe 1)

B. Matériel et Méthodes

1. Patients et Prélèvements

a) Description de la cohorte.

L'étude porte sur des patients séropositifs pour le VIH suivis à l'Hôtel Dieu de Nantes participant à la cohorte PLACEVIH. Un consentement éclairé autorisant l'utilisation des prélèvements pour la recherche a été signé par tous les patients. Deux tubes de sang héparinés et un tube de sang EDTA de 7ml sont prélevés dans le Service d'Infectiologie du CHU de Nantes, puis acheminés au laboratoire de virologie du CHU.

Parmi les patients de la cohorte, nous nous sommes intéressés aux patients remplissant les critères d'inclusion suivants :

-Le groupe « Naïfs » de traitement ou « N »: Patients séropositifs n'ayant jamais reçu de traitement antirétroviral.

-Le groupe en échec virologique ou « 3TC »: Patients suivant un traitement antirétroviral incorporant le 3TC et se trouvant en échec virologique (charge virale supérieure à 50 copies/ml), ou chez qui la mutation M184V a été détectée par séquençage au cours des douze mois précédents.

La charge virale et le taux de lymphocytes T CD4⁺ des patients sont mesurés dans le cadre du suivi médical. Les valeurs indiquées dans cette étude ont été relevées dans leur dossier protégé par un numéro d'anonymat.

b) Préparation et stockage des cellules.

Les prélèvements de sang sur Héparine sont centrifugés sur gradient de Ficoll (Amersham, Uppsala, Suède) afin d'isoler les PBMC (Peripheral Blood Mononuclear Cell) qui sont reprises dans du SVF (Sérum de Vœu foetal) froid à raison de 5 millions de cellules par 500 µl de SVF. 500µl de la suspension cellulaire sont distribués dans des cryotubes™ Nunc (Thermofisher Scientific, EU), dans 500 µl de RPMI-DMSO 20% Les tubes sont congelés à -80°C à une vitesse de diminution de température contrôlée grâce à un container de congélation (Nalgène, Thermofisher Scientific, EU) puis transférés dans l'azote liquide.

2. Phénotypage HLA-A2⁺ sur sang total

50µl de sang total sur EDTA sont incubés à température ambiante à l'abri de la lumière pendant 30 minutes en présence de 5 µl d'un anticorps monoclonal anti-HLA-A2⁺ couplé à la phycoérythrine (PE) (clone BB7.2, AbD Serotec, RU). Les hématies sont ensuite lysées par l'ajout de 1,2 ml de tampon de lyse: NH₄Cl (0,15M), NaHCO₃ (0,01M), EDTA (0,012M) à pH 7,2-7,4. Après incubation à température ambiante pendant 10 minutes, les leucocytes sont récupérés par centrifugation et repris dans du PBS. Les cellules marquées sont lavées une fois au PBS, centrifugées et fixées dans du PBS-0,75% formaldéhyde, avant analyse par cytométrie en flux.

3. Phénotype des lymphocytes CD8⁺ et CD4⁺ sur cellules décongelées.

Les caractéristiques des anticorps monoclonaux, et les dilutions utilisées sont présentées dans le tableau III. Tous les anticorps ont été fournis par BD Biosciences (San José, EU)

Tableau III: Anticorps utilisés pour le marquage des lymphocytes.

Antigène	Clone	Fluorochrome	Volume utilisé/ 5.10 ⁴ cellules
IgG2a	MOPC-21	FITC	2µl
IgG2a	MOPC-21	PE	5µl
CD4	SK3	APC	1µl
CD8	RPA-T8	PE-Cy7	5µl
HLA-DR	G46-6	PE	5µl
CD38	HIT2	FITC	5µ
CD27	(M-T271)	FITC	5µl
CD28	CD28.2	PE	5µl
CD279 (PD-1)	MIH4	FITC	2µl

Les PBMC sont décongelées et reprises dans du RPMI-10% SVF à une concentration de 10⁶ cellules par ml, 50µl de la suspension cellulaire sont incubés pendant 30 minutes à l'abri de la lumière en présence des différents anticorps.

Comme témoins négatifs de marquage on utilise l'IgG2a murine couplée au FITC et l'IgG2a murine couplée au PE. Les cellules marquées sont lavées une fois au PBS, centrifugées et fixées dans du PBS-0, 75% formaldéhyde, avant analyse en cytométrie en flux

4. Analyse des résultats de cytométrie en flux.

L'analyse est réalisée sur un cytomètre quatre couleurs FACS Canto équipé du logiciel FACS Diva (BD Biosciences, San José, EU). La région lymphocytaire est identifiée selon la morphologie cellulaire sur le cytogramme biparamétrique FSC (forward scatter) X SSC (side scatter). L'analyse est effectuée sur 20.000 cellules appartenant à cette région. Les résultats de cytométrie seront exprimés comme pourcentages de cellules marquées (CD38⁺, HLA-DR⁺) ou non marquées (CD27⁻, CD28⁻). Pour PD-1-FITC les résultats seront exprimés en intensité médiane de fluorescence (MFI).

5. Quantification de la réponse CTL par ELISpot IFN- γ .

a) Protocole expérimental

La technique d'ELISpot IFN- γ permet de détecter et quantifier l'activation des CTL suite à une stimulation par des peptides. Cette activation se traduit par la sécrétion d'IFN- γ , qui sera captée par des anticorps immobilisés sur nitrocellulose, et révélée par une technique d'ELISA sandwich. La révélation aboutit à la visualisation d'une tache ou « spot » d'un produit violet sur le fond du puits. Un spot représente une cellule productrice d'IFN- γ . En comptant le nombre de spots, il est possible de quantifier le nombre de CTL spécifiques d'un peptide donné présents dans l'échantillon.

Le protocole expérimental utilisé est celui décrit par Dalod (Dalod et al., 1998). Une plaque de 96 puits de nitrocellulose (Millipore, Billerica, EU) est sensibilisée avec 100 μ L/puits d'anticorps anti-IFN- γ humain (clone 1-D1K, Mabtech, Nacka Strand, Suède) dilué à 1 μ g/mL en PBS (1X), puis incubée pendant une nuit à 4°C. Les puits sont ensuite lavés deux fois avec 150 μ L de milieu complet de culture (RPMI-10%SVF) et incubés pendant 2 heures avec 200 μ L de milieu complet. Après élimination de ce milieu, 100 μ L de la suspension de cellules décongelées reprises dans du RPMI-10% SVF, sont distribués dans chaque puits de façon à déposer 1.10⁵cellules/puits. Dans les puits « témoins positifs » la suspension cellulaire est diluée afin de déposer 1500 cellules/puits.

Dans un deuxième temps les différents peptides stimulants décrits dans le tableau IV (synthétisés par NeoMPS, Strasbourg, France) sont distribués à une concentration finale de 3 μ M. Le PMA (Sigma-Aldrich St Louis, MO, EU) et de l'ionomycine (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EU) sont distribués dans les puits témoin positif à 100 μ g/ml et 10 μ g/ml, respectivement. Chaque condition est testée en triplicate.

La plaque est incubée 24h à 37°C sous 5% CO₂. Après 6 lavages en PBS Tween 20 (0,05%), 100 μ L d'anti-IFN- γ humain biotinylé (clone : 7-B6-1, Mabtech, Nacka Strand, Suède) à 1 μ g/mL sont distribués dans chaque puits et les plaques sont incubées pendant 90 minutes à l'étuve 37°C, 5% CO₂.

Les puits sont ensuite lavés 6 fois avec 200 μ L de PBS Tween 20 (0,05%) et 100 μ L de phosphatase alcaline couplée à la Streptavidine (Sigma-Aldrich, St Louis, EU) diluée au 1/5000^{ème} sont distribués dans chaque puits. Après incubation d'une heure à température ambiante et 6 lavages avec 200 μ L de PBS 1X Tween 20 (0,05%), 100 μ L de substrat BCIP/NBT (Sigma-Aldrich St Louis, EU) sont rajoutés dans les puits et les plaques sont laissées 30 minutes à température ambiante à l'abri de la lumière. Lorsque les spots sont visibles et la coloration violette homogène, les puits sont lavés à l'eau distillée, les plaques sont décontaminées avec du détergent Anios et séchées sous l'hotte (Figure 15).

Tableau IV: Peptides utilisés dans la technique d'ELISpot

Peptide	Séquence	Protéine Cible	Position dans la protéine.
IV8	ICPMYARV	β -galactosidase (<i>E.coli</i>)	497-504
VL9M	VIYQYMDDL	RT	179-187
VL9V	VIYQYVDDL	RT	179-187
YV9M	YQYMDDLIV	RT	181-189
YV9V	YQYVDDLIV	RT	181-189
IV9	ILKEPVHGV	RT	309-317
SL9	SLYNTVALTL	<i>Gag</i>	77-85

b) Lecture de la plaque ELISpot

Le nombre de spots par puits est compté sur un lecteur ELISpot (Autoimmun Diagnostika GmbH), chaque spot représentant une cellule sécrétrice d'IFN- γ (SFC - spot forming cell). Les résultats sont exportés en format d'une feuille Microsoft Excel. Afin de normaliser les résultats des différentes conditions de stimulation, le nombre de SFC par puits est rapporté en SFC par million de cellules.

Seules les cellules répondant correctement au témoin positif sont prises en compte (Moyenne de réponse du témoin positif supérieur à 20000 SFC par million de cellules).

**c) Élimination systématique des valeurs aberrantes
« outliers »**

La moyenne, l'écart type et le coefficient de variation sont calculés pour chaque triplicate. Si le coefficient de variation est supérieur à 40%, les trois puits sont vérifiés sur l'image de la plaque et dans le fichier des résultats Excel. Lorsqu'un artefact est constaté (par exemple, des traces de pipette sur le fond du puits) la plaque est recomptée en excluant la zone touchée. Si le coefficient de variation du triplicate reste supérieur à 40%, le puits incriminé est exclu, et la moyenne est calculée sur les deux puits restant.

Cette procédure permet d'éliminer les artefacts de mesure qui peuvent être occasionnés par le lecteur et/ou par des erreurs de manipulation.

d) Calcul du seuil de positivité.

Une réponse spécifique à un peptide est considérée comme positive si sa valeur est supérieure aux deux valeurs suivantes :

1-La moyenne plus deux écarts types du triplicate du témoin négatif (peptide IV8)

2-La moyenne du triplicate du témoin négatif plus 50 SFC / million (Samri et al., 2000)

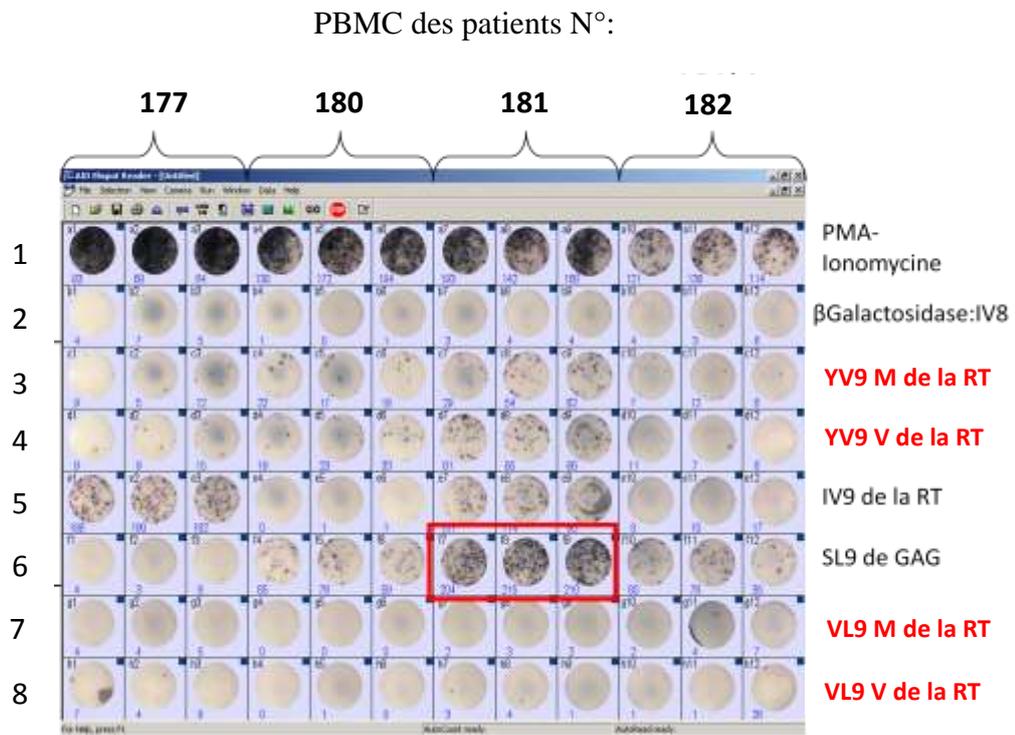


Figure 15: Exemple d'un résultat de révélation d'une plaque ELISpot

Les réponses de quatre patients (testées en triplicate) sont représentées. La ligne 1 et 2 représentent les témoins positifs (ligne 1, stimulation par le PMA-iono) et négatifs (ligne 2, stimulation par le peptide IV8 de la β Galactosidase). Les lignes 3 à 8 représentent la synthèse d'IFN- γ en réponse à la stimulation par les peptides YV9M, YV9V, IV9, SL9 VL9M et VL9V. Les puits encadrés en rouge représentent la réponse IFN- γ positive du patient 181 au peptide SL9 de Gag

6. Clonage et Lignée CTL

Les lignées CTL et les clones ont été obtenus par stimulation de PBMC des patients avec YV9 (M ou V) à une concentration de 10 μ M pendant 3h.

Les cellules sécrétrices d'IFN- γ sont sélectionnées par tri sur billes magnétiques sur colonne. Le tri est effectué en suivant les instructions du fabricant (MACS, Miltenyi, Allemagne).

Les cellules triées sont ensuite cultivées pendant dix jours en présence d'un milieu de stimulation comprenant: Cellules nourricières irradiées (1×10^4 EBV-B, 1×10^5 PBMC d'un donneur sain), PHA-L (1 μ g/mL) et IL-2 (150 U/mL). On obtient ainsi une lignée cellulaire spécifique du peptide stimulé.

Pour obtenir les clones, une étape de dilution limite est nécessaire. Les cellules sont diluées à une concentration de 6 cellules/ml et 50 µl (0,3 cellules /puits) sont mis en culture en milieu de stimulation. Les cellules obtenues sont testées fonctionnellement pour sélectionner les clones spécifiques. La clonalité est finalement vérifiée par le séquençage des TCR effectué par le pôle de séquençage de l'IFR26, Nantes.

Un clone spécifique de YV9M issus des PBMC du patient 181 du groupe N a été obtenu. Après deux tentatives de clonages des CTL spécifiques de YV9V issue des PBMC du patient 193 appartenant au groupe 3TC, nous avons obtenu un seul clone qui n'a pas pu être cultivé suite à une contamination par mycoplasme.

7. Avidité Fonctionnelle.

Des lignées CTL ou des clones ont été isolés à partir des PBMC de patients afin de tester leur avidité fonctionnelle vis-à-vis des épitopes. Les cellules ont été stimulées par des concentrations décroissantes (3 µM-0,3 pM) du peptide YV9 muté ou sauvage, et la réponse fonctionnelle à chaque concentration est quantifiée par ELISpot. Le nombre de SFC est analysé en fonction de la concentration du peptide stimulant et l'EC₅₀ est définie comme la concentration peptidique qui donne une réponse fonctionnelle à 50% de la réponse maximale. L'avidité fonctionnelle est définie comme l'inverse de cette valeur. Les valeurs exactes de l'EC₅₀ sont calculées en utilisant le logiciel NCGC Curve Fit (<http://ncgc.nih.gov/pub/openhts/curvefit/>).

8. Séquençage de la RT (VIH-1)

L'ARN viral est purifié à partir du plasma des prélèvements effectués le jour de l'entrée dans l'étude suivant le Kit MagnaPure LC (Roche Diagnostics, Meylan, France). Le domaine N-terminal et le domaine central du gène de la RT sont amplifiés par une PCR à une étape à l'aide du Kit one-step RNA PCR kit (Takara Bio par Lonza, St-Beauzire, France).

Les amorces utilisées sont les suivantes MJ4C – AGTGCTTTGGYCCCTRAGGAGT; MJ3 AGTAGGACCTACACCTGTCA. Les produits PCR sont purifiés et séquencés par le Kit BigDye Terminator kit et analysés avec le programme 3130 Genetic (Applied Biosystems, Forster City, EU).

9. Tests statistiques

Pour la comparaison des valeurs quantitatives (SFC, Pourcentages de Fluorescences, Intensités médianes de fluorescence) le test de Wilcoxon non paramétrique a été utilisé (http://www.fon.hum.uva.nl/Service/Statistics/Wilcoxon_Test.html)

Pour la comparaison des résultats qualitatifs des deux groupes le test exact de Fisher (two-tailed) a été préféré au test de Chi-deux, car ce test est considéré plus efficace pour des faibles effectifs comme ceux analysés dans cette étude. (<http://statpages.org/ctab2x2.html>)

Pour la comparaison de la réponse d'un même patient à deux épitopes différents on utilise le test de Wilcoxon apparié :

(http://www.fon.hum.uva.nl/Service/Statistics/Signed_Rank_Test.html).

Pour analyser la corrélation entre les intensités de réponse ELISpot mesurée contre deux épitopes différents, une régression linéaire a été effectuée:

(http://faculty.vassar.edu/lowry/corr_stats.html)

Pour établir la corrélation entre les différentes variables et la réponse ELISpot ; une analyse multivariée est effectuée (<http://statpages.org/logistic.html>)

Une comparaison est considérée significativement différente lorsque p est inférieur à 0,05.

C. Résultats

1. Comparaison des caractéristiques virologiques et immunologiques des patients entre le groupe N et 3TC.

a) Age, charge virale, CD4, co-infections VHB-VHC

Au total 19 patients appartenant au groupe non traité (N) et 15 appartenant au groupe en échec virologique (3TC) ont été recrutés. Leurs caractéristiques immunologiques sont résumées dans le tableau V.

Tableau V: Comparaison des caractéristiques immunobiologiques entre le groupe de patients naïfs de traitement (N) et le groupe en échec virologique sous 3TC (3TC)

	N (n=19)	3TC (n=15)	p
Age médian	43(24-58)	45(30-72)	0,640
Médiane CV (log)	4,7(<1,6-6,4)	2,8(<1,6-3,8)	0,003
Médiane CD4/mm³	532(95-949)	336(64-1006)	0,499
Médiane Nadir CD4/mm³	354(95-763)	170 (22-268)	p<0,001
Patients infectés VHB⁺	0	2	0,187
Patients infectés VHC⁺	2	4	0,173

Les deux groupes sont homogènes en termes d'âge et de taux de CD4. Les proportions de patients co-infectés par VHB ou VHC ne diffèrent pas entre les deux groupes. Par contre, la charge virale médiane au moment de l'inclusion dans l'étude des patients naïfs est significativement supérieure dans le groupe N par rapport au groupe 3TC ($p<0,05$). Le Nadir de CD4 est inférieur pour le groupe 3TC ($p<0,05$).

b) Séquençage du gène de la RT

Les séquences de la région de la RT comprise entre les acides aminés 177 et 199 des patients présentées dans le tableau VI confirment le fait que chez les patients du groupe N la population majoritaire des virus possèdent une méthionine à la position 184, et que tous les patients en échec virologique (Groupe 3TC) recrutés pour l'étude (à l'exception du patient 121) présentent la mutation M184V.

L'analyse détaillée des séquences environnantes (+ ou - 10 acides aminés) de l'épitope montre que les cinq acides aminés qui suivent l'épitope par l'extrémité C-terminale sont

conservés et stables pour tous les patients de l'étude. Par contre nous observons des polymorphismes dans la séquence N-terminale environnante de l'épitope. La position de polymorphisme la plus fréquemment observée est la position 177 pour laquelle trois acides aminés sont retrouvés: Acide Glutamique(E) (23%), Acide Aspartique(D) (65%) ou Asparagine(N) (12%). D'autres polymorphismes sont observés en position 178 et en position 174, mais ceux-ci sont beaucoup moins fréquents (tableau VI).

Tableau VI: Séquences de la RT virale entre les acides aminés 171 et 199

	Séquence Épitope +/- 10 a.a			
Position sur RT :	171	181	189	199
Patients Naïf				
122	PFRKQNP	D	I	V
123	PFRKQNP	N	I	V
124	PFRKQNP	D	I	I
129	PFRKQNP	E	V	I
131	PFRKQNP	D	I	V
132	PFRKQNP	E	M	V
150	PFRKQNP	D	I	V
155	PFRKQNP	E	I	V
157	PFRKQNP	E	I	V
160	PFRKQNP	E	I	V
167	PFRKQNP	D	I	V
174	PFRKQNP	D	I	V
175	PFRKQNP	D	I	V
177	PFRKQNP	D	M	V
181	PFRKQNP	D	I	V
182	PFRKQNP	D	I	V
185	PFRKQNP	D	I	V
186	PFRKQNP	E	V	I
188	PFRKQNP	D	I	V
Patients 3TC				
87	PFRKQNP	D	I	V
93	PFRKQNP	D	I	I
116	PFRKQNP	D	I	V
228	PFRKQNP	D	I	I
153	PFRKQNP	D	I	V
173	PFRKQNP	D	I	V
180	PFRKQNP	D	I	V
193	PFRKQNP	E	M	V
48	PFRKQNP	E	L	V
208	PFRKQNP	D	I	V
247	PFRKQNP	N	I	V
253	PFRKQNP	D	I	V
309	PFRKQNP	D	I	V
121	PFRKQNP	N	I	V
207	PFRKQNP	N	I	V

c) Immunophénotypage des lymphocytes CD8⁺

Le phénotype des lymphocytes CD8⁺ des patients a été analysé pour chaque patient au moment de l'inclusion. En effet, la réponse fonctionnelle des lymphocytes T CD8⁺ mesurée directement *ex vivo* par la technique d'ELISpot peut-être influencée par l'état d'activation et de différenciation des CTL chez les patients. Nous avons analysé le phénotype global des lymphocytes T CD8⁺ circulant chez les patients des groupes N et 3TC. Les marqueurs utilisés sont le HLA-DR et le CD38, afin de définir la population de lymphocytes T CD8⁺ activés (HLA-DR⁺CD38⁺); le CD28 et le CD27, qui permettent de distinguer des lymphocytes T CD8⁺ différenciés en CTL matures (CD28⁻; CD27⁻) (Appay et al. 2002) et le PD-1, qui a récemment été décrit comme un marqueur de "l'épuisement" des lymphocytes T chez les patients séropositifs pour le VIH. (Day et al., 2006).

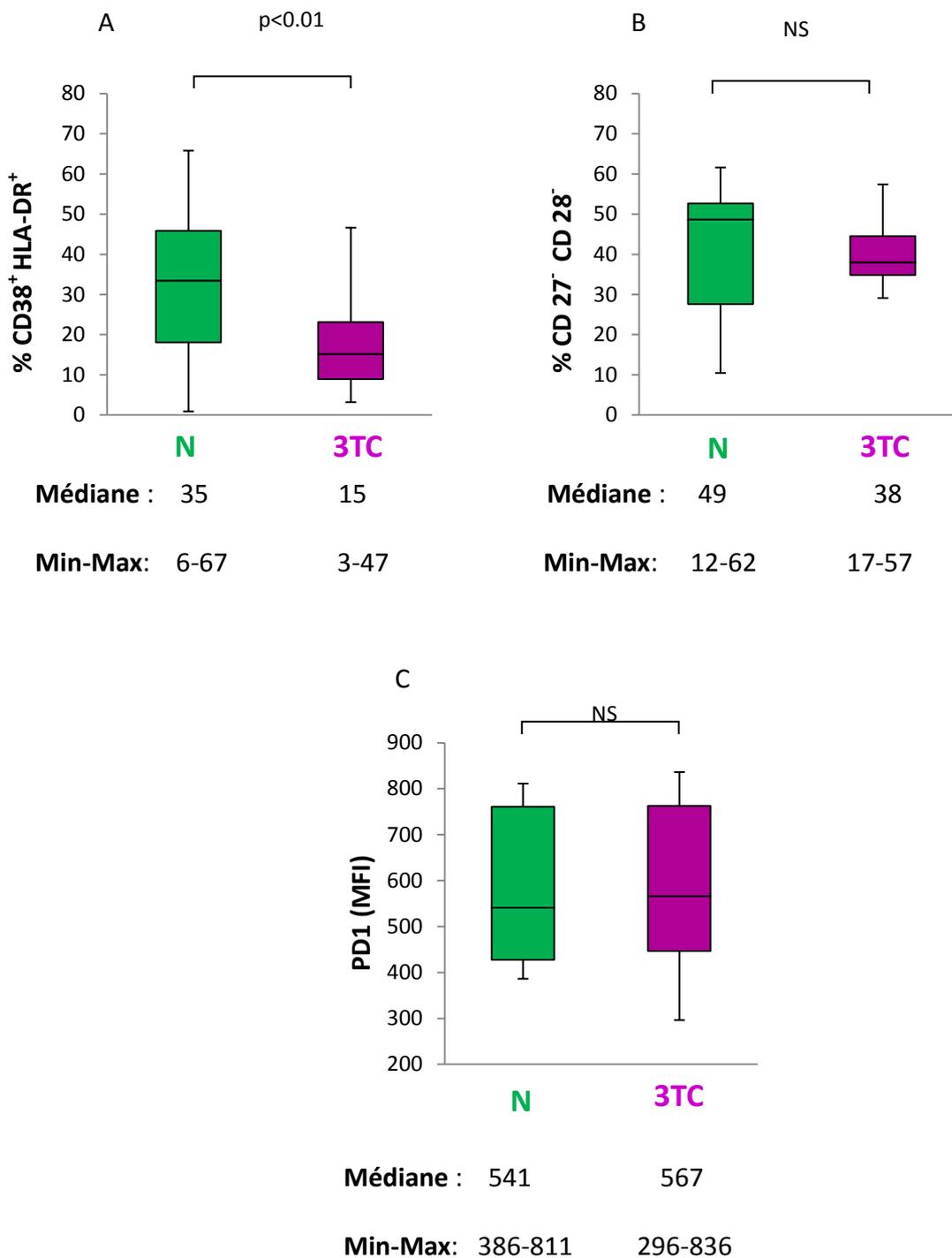


Figure 16: Comparaison de l'expression des marqueurs des lymphocytes CD8⁺ au sein des deux groupes N et 3TC

Les comparaisons de valeurs médianes de l'expression des différents marqueurs mettent en évidence une augmentation des marqueurs d'activation CD38/HLA-DR dans le groupe N (A), alors qu'il n'existe pas de différence significative d'expression des marqueurs de différenciation (B) ou d'épuisement (C)

Les LT CD8⁺ des patients des deux groupes sont comparables en termes de différenciation et d'épuisement (Figure 16 Bet C). Pourtant les LT CD8⁺ des patients du groupe N présentent en médiane un état plus activé que ceux du groupe 3TC (Figure 16A).

2. Réponses IFN- γ à la stimulation par différents peptides : Comparaison Groupe 3TC/N

a) Mesure de la réponse IFN- γ de deux peptides de référence

La réponse ELISpot contre deux épitopes CTL: IV9 (RT 309-317) et SL9 (Gag: 77-85) est testée systématiquement. La fréquence de reconnaissance de ces épitopes au sein de chaque groupe est synthétisée dans le tableau VII et l'intensité, mesurée en nombre de cellules formant un spot (SFC) par million de PBMC, est représentée sur la figure 17.

Tableau VII : Tables de Fisher comparant la fréquence des réponses ELISpot détectées entre les deux groupes Naïf et 3TC.

p représente la *p*-value du test Exact de Fisher comparant les deux groupes N et 3TC
A : Réponse contre l'épitope IV9 ; *B* : Réponse contre l'épitope SL9

a

p=0,72		IV9 (RT)	N	3TC
Réponses ELISpot :	Détectée		8	5
	Absente		11	10

b

p=1		SL9 (Gag)	N	3TC
Réponses ELISpot :	Détectée		10	7
	Absente		9	8

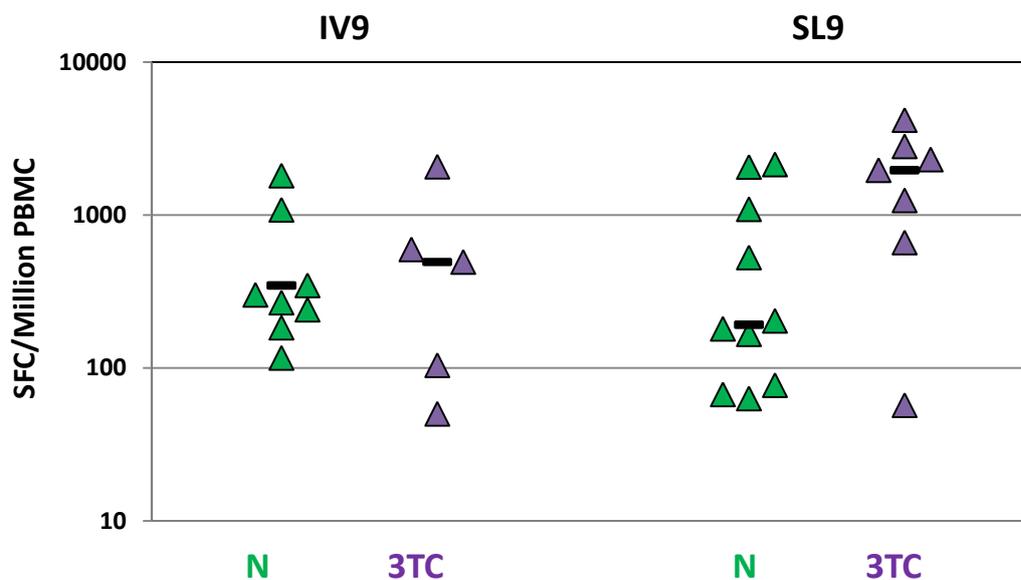


Figure 17: Réponse IFN- γ mesurée par ELISpot des patients 3TC et N contre les épitopes de références IV9 (RT) et SL9 (Gag) restreints HLA-A2⁺

*Seuls les Patients ayant une réponse positive sont représentés.
Le trait noir représente la médiane*

Le peptide SL9, qui est l'épitope immunodominant de la protéine p17 de Gag dans le contexte du HLA-A2, est le plus fréquemment reconnu dans notre étude, avec 17 des 34 patients (50%) montrant une réponse détectable. Parmi les patients du groupe 3TC, 7 patients sur les 15 présentent une réponse, alors que 10 patients sur 19 du groupe N montrent une réponse contre cet épitope (tableau VII b). La fréquence de reconnaissance est comparable entre les deux groupes ($p=1$ test exact de Fisher). L'intensité des réponses détectées semble plus faible chez le Groupe N (Médiane: 191,5 Range: 63-2140 SFC/ 10^6 PBMC) comparé au groupe 3TC (Médiane: 1960, Range: 57- 4160 SFC/ 10^6 PBMC) (figure 17), mais cette différence n'était pas significative ($p=0,4$ test de Wilcoxon).

Le peptide IV9 est décrit comme l'épitope immunodominant de la RT dans le contexte HLA-A2⁺ (Tsomides, et al., 1991). Il est situé dans le domaine C-terminal de la RT, qui ne contient pas de mutation de résistance aux inhibiteurs de la RT. La séquence de l'épitope ne varie pas en fonction du traitement anti-rétroviral. Dans notre étude, 30% des patients HLA-A2⁺ ont une réponse EliSpot détectable contre le peptide IV9. Les fréquences et intensités de réponses sont comparables au sein des deux groupes ($p=0,72$ Test exact de Fisher et $p=1$

Test Wilcoxon) (tableau VII a, figure 17).

Nos résultats montrent donc une fréquence élevée de réponse dirigée contre les épitopes viraux de référence SL9 et IV9, avec des niveaux comparables quelque soit le groupe de patients étudiés ce qui implique qu'il n'existe donc pas de différence de réponse IFN- .

b) Réponse IFN- γ contre l'épitope contenant la mutation M184V

(1) Détermination de l'épitope à étudier

Dans un premier temps, pour pouvoir étudier l'influence de la mutation M184V dans la réponse CTL il fallait définir l'épitope le plus fréquemment reconnu. Deux peptides, VL9 (Harrer et al., 1996) et YV9 (Samri et al., 2000), restreints par HLA-A2 ont été proposés comme épitopes couvrant la position 184 de la RT (figure 18). Dans notre étude sur 34 patients testés, aucune réponse n'a été observée ni pour le peptide VL9 sauvage ni pour le peptide VL9 muté. En revanche, 12 patients sont capables de reconnaître YV9M (34%) et 13 patients reconnaissent l'épitope YV9V (37%). Nous pouvons donc conclure que le peptide YV9 situé en position RT181-189 est le véritable épitope reconnu chez les patients HLA-A2⁺, et non pas le peptide VL9.

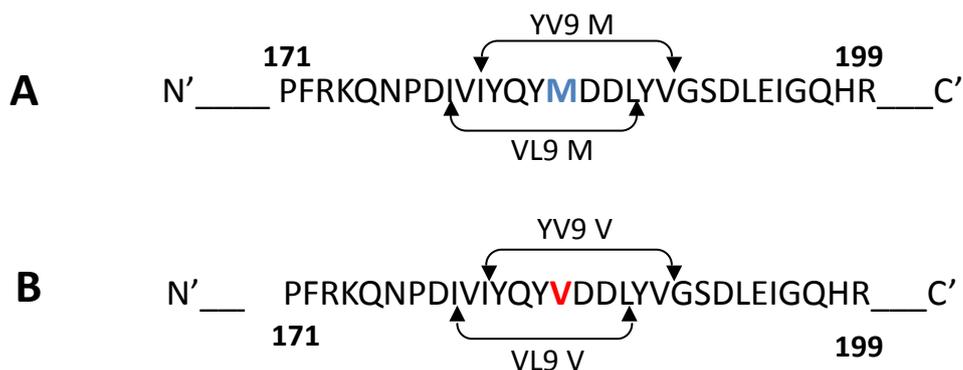


Figure 18 : Séquence en acides aminés de la région de la RT contenant les épitopes VL9 et YV9

- A. Séquence consensus virus sauvage
- B. Virus porteur de la mutation M184V

(2) Comparaison de la réponse dirigée contre l'épitope YV9 entre les deux groupes

La réponse IFN- γ contre YV9M et YV9V est mesurée pour les 34 patients de l'étude, la fréquence de reconnaissance au sein de chaque groupe est synthétisée dans le tableau VIII et l'intensité de la fréquence présentée dans la figure 19

Tableau VIII: Tables de Fisher comparant la fréquence des réponses ELISpot détectées entre les deux groupes Naïf et 3TC.

p représente la *p*-valeur du test Exact de Fisher comparant les deux groupes N et 3TC

A : Réponse contre l'épitope l'épitope sauvage YV9M ; B : Réponse contre l'épitope muté YV9V

a

Réponses ELISpot :		YV9M(RT)	N	3TC
	Détectée		10	2
	Absente		9	13

$p=0,03$

b

Réponses ELISpot :		YV9V (RT)	N	3TC
	Détectée		9	4
	Absente		10	11

$p=0,23$

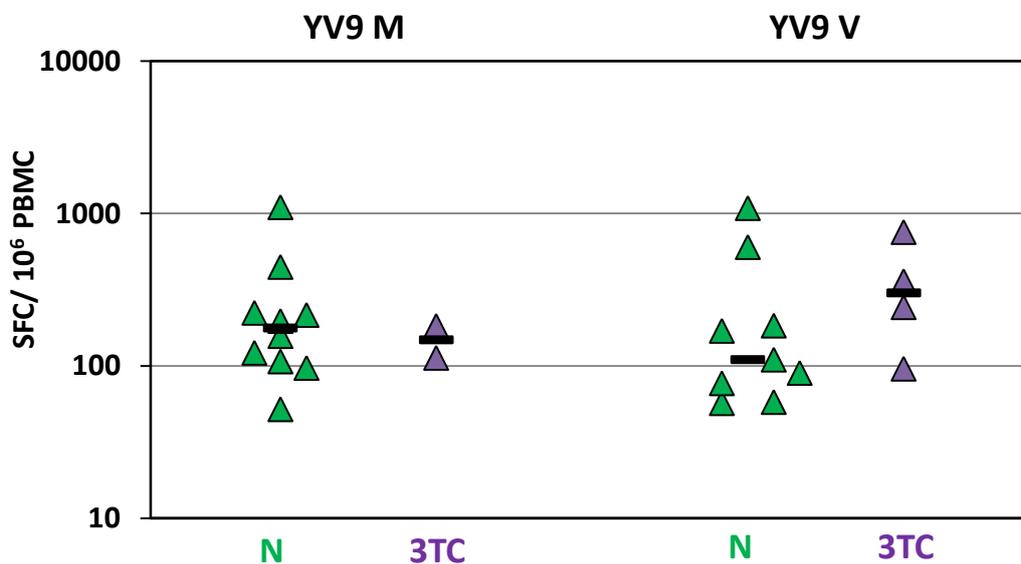


Figure 19: Réponse IFN- γ mesurée par ELISpot des PBMC des patients N et 3TC contre les épitopes YV9 M et YV9 V restreints par HLA-A2⁺

*Seuls les Patients ayant une réponse positive sont représentés.
Le trait noir représente la médiane*

Les patients du groupe N reconnaissent de manière fréquente l'épitope YV9M (n= 10, 53%) tandis que la fréquence de reconnaissance de YV9M par les patients du groupe 3TC est plus faible (test exact de Fisher $p=0,03$) (tableau VIII a). En effet, seulement deux patients du groupe 3TC sur les 15 (15%) présentent une réponse détectable contre YV9M.

Dans un premier temps, ce résultat partiel pourrait nous inciter à envisager la mutation M184V comme une mutation d'échappement: En effet les patients ayant une séquence sauvage reconnaissent de manière fréquente l'épitope, alors que chez les patients sous 3TC pour lesquels la population virale majoritaire possède la mutation M184V, la fréquence de reconnaissance est significativement plus faible.

Toutefois, les réponses ELISpot observées contre l'épitope YV9V montrent que les patients du groupe N reconnaissent aussi de manière fréquente l'épitope muté YV9V (n=9, 47%).

De plus, quatre patients du groupe 3TC reconnaissent le peptide muté YV9V, même si cette fréquence est inférieure à celle observée au sein du groupe N, la différence n'est pas significative.

Ces résultats sont singuliers du fait que les patients du groupe N (absence de virus mutés) sont capables de répondre aux deux peptides (sauvage et muté), alors que les patients en échec virologique (présence de virus M184V) ne répondent que marginalement à cet épitope.

Ces observations nous ont menés à investiguer plus en détail les facteurs qui influencent la présence ou l'absence de reconnaissance des épitopes sauvage ou muté.

3. La mutation M184V : Une mutation d'échappement aux CTL ?

a) Réponse contre YV9M et YV9V dans le groupe N.

L'étude détaillée de la réponse contre YV9 dans le groupe N montre que ce sont les mêmes patients répondant à YV9M qui répondent à YV9V (figure 20).

Pour le seul patient (188), pour lequel une réponse positive est observée contre YV9M et non contre YV9V, la réponse contre l'épitope muté se trouve juste sur le seuil de détectabilité.

Les deux hypothèses pouvant expliquer une telle réponse sont :

-La présence de deux types de CTL dans les PBMC des patients, une population

reconnaissant spécifiquement YV9M et une autre reconnaissant YV9V.

-La reconnaissance des deux épitopes YV9M et YV9V par les mêmes CTL. On parle alors de réponse croisée.

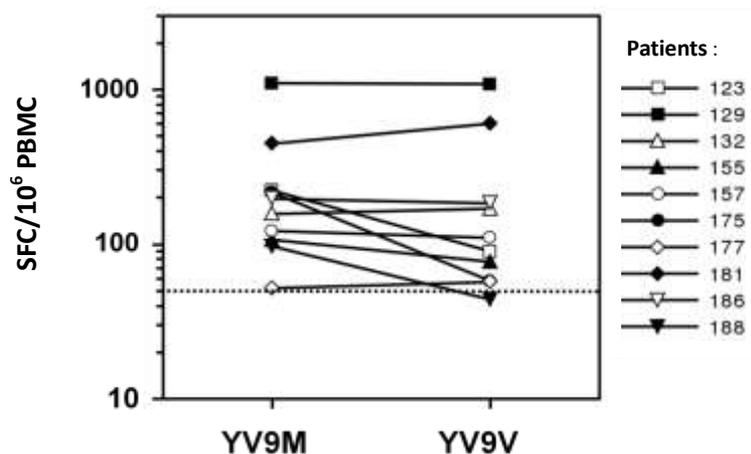


Figure 20: Réponse IFN- γ mesurée par ELISpot contre YV9M et YV9V parmi les patients du groupe N

*Seuls les patients ayant une réponse positive sont représentés y compris le patient 188 pour lequel la réponse contre YV9V se trouve sur le seuil de détectabilité.
Le seuil de détectabilité est indiqué en pointillé*

L'intensité de la réponse YV9 (M ou V) varie d'un patient à un autre (de 50 à 1100 SFC/10⁶ PBMC), mais en général un individu répond à YV9M et à YV9V avec une intensité équivalente. Par exemple, le patient 129 présente une réponse contre YV9M de 1100 SFC/10⁶ PBMC et contre YV9V de 1086 SFC/10⁶ PBMC, la différence n'est que de 14 SFC/10⁶ PBMC (figure 20).

En effet, l'intensité de la réponse ELISpot spécifique de YV9V est fortement corrélée avec celle de YV9M avec une pente extrêmement proche de 1, argument qui est en faveur de l'hypothèse de la réactivité croisée (figure 21 A). Effectivement, l'intensité ELISpot contre un autre épitope de la RT, le IV9, est complètement indépendante à la réponse contre YV9M. Dans le cas où il existerait deux populations CTL différentes reconnaissant YV9M et YV9V respectivement, leur réponses devraient être également indépendantes (figure 21 B).

Ces observations appuient l'hypothèse d'une réponse croisée existante entre YV9M/ YV9V.

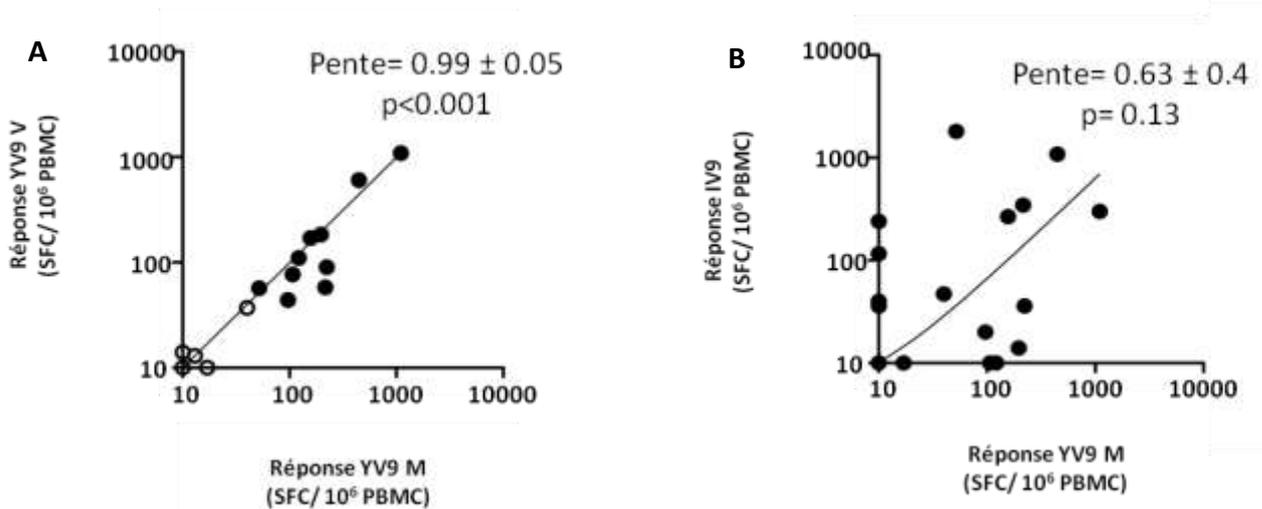


Figure 21: Corrélation entre l'intensité de la réponse ELISpot contre YV9M et autres épitopes de la transcriptase inverse.

A : Corrélation entre les réponses ELISpot dirigées contre YV9M et contre YV9V

B : Corrélation entre les réponse ELISpot dirigées contre YV9M et contre IV9

b) Avidité fonctionnelle d'un clone spécifique de YV9M

Afin de confirmer la reconnaissance croisée entre l'épitope YV9M/YV9V, nous avons isolé un clone (8D10) spécifique de YV9M à partir des PBMC du patient 181. Les PBMC de ce patient présentent une réponse forte contre YV9M (446 SFC/10⁶ PBMC) et contre YV9V (603 SFC/10⁶ PBMC). L'évaluation de la réponse de 8D10 en réponse à une gamme de concentrations des peptides YV9M ou YV9V montre que l'avidité fonctionnelle est la même pour les deux nonamères (figure 22). Un seul TCR est donc capable de reconnaître les deux épitopes avec la même avidité (tableau IX).

Tableau IX: Séquence TCR du clone 8D10

	Segment variable	CDR3
α	AV6S1	CAL GGSNQAGTAL IFG
β	BV7.9	CAS SLALGGSTYEQ YFG

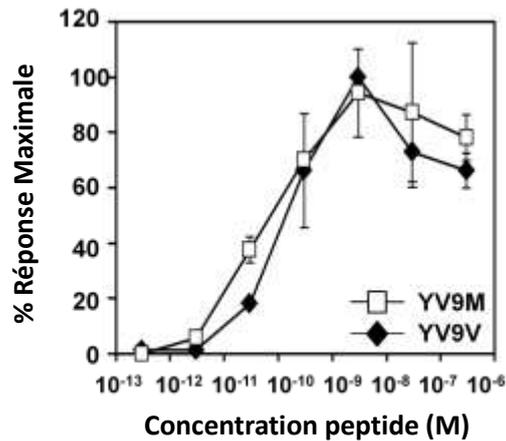


Figure 22: Avidité fonctionnelle du Clone 8D10 contre YV9M et YV9V

Les intensités de la réponse IFN- γ , sont représentées comme des valeurs relatives par rapport à la valeur maximale obtenue (100%).

Tous les arguments réunis confirment que la réponse CTL spécifique de YV9M croise avec YV9V. La mutation M184V n'est donc pas une mutation d'échappement car les TCR capables de reconnaître la séquence sauvage reconnaissent aussi la séquence mutée.

4. Réponse ELISpot spécifiquement dirigée contre YV9V dans le groupe 3TC

Dans le groupe en échec virologique sous 3TC, la fréquence de la réponse contre l'épitope YV9M est significativement plus faible que celle du groupe contrôle. Si la mutation M184V n'est pas une mutation d'échappement, comment peut-on expliquer ce phénomène ?

En effet, deux types de réponse contre YV9 (M ou V) sont observés au sein du groupe 3TC. Deux patients (180 et 228) reconnaissent l'épitope sauvage YV9M et l'épitope YV9V avec des intensités comparables. Cette réponse est similaire à celle observée chez les patients du groupe contrôle. Il s'agit probablement d'une réponse mémoire développée contre YV9M et qui croise avec YV9V.

Par contre, deux patients (48 et 193) présentent une réponse spécifique contre YV9V qui ne croise pas avec l'épitope sauvage (figure 23).

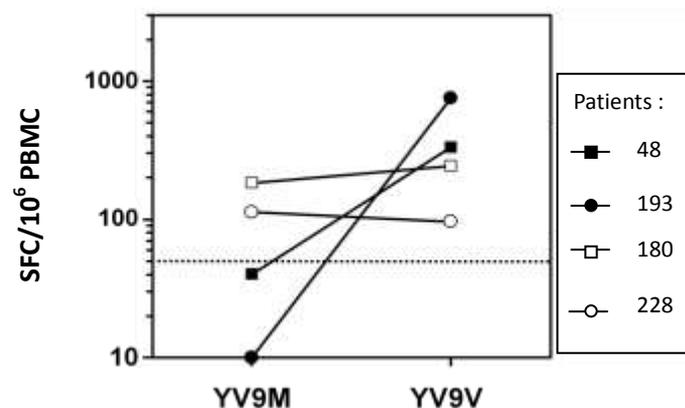


Figure 23: Réponse IFN-γ mesurée par ELISpot contre YV9V et YV9M au sein du groupe 3TC.

Seuls les patients ayant une réponse détectable sont représentés. Le seuil de détectabilité est montré en pointillé

L'analyse de l'évolution des charges virales VIH dans le groupe 3TC, permet d'observer deux profils différents: Neufs patients appartenant à ce groupe sont en échec persistant c'est-à-dire qu'ils présentent une charge virale plasmatique détectable depuis plus de six mois (figure 24 A). Les six autres patients du groupe 3TC présentent un échec transitoire de moins de trois mois avant l'inclusion dans l'étude (figure 24 B).

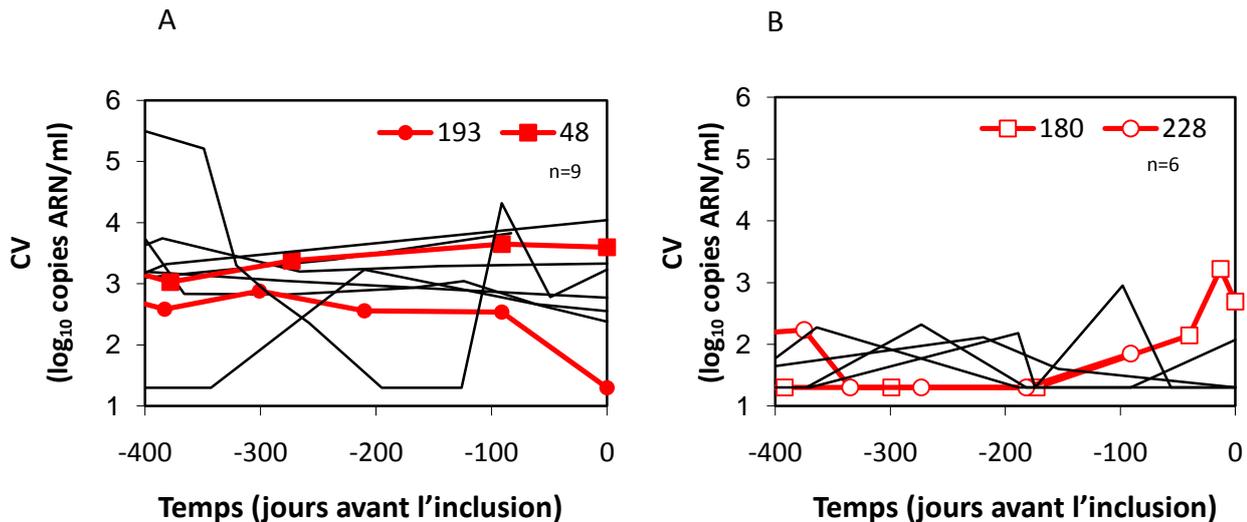


Figure 24: Évolution de la charge virale des patients en échec virologique

(A) Échec persistant (B) Échec transitoire

Les patients dont les courbes apparaissent en rouge sont ceux pour lesquels la réponse IFN- γ est observée soit contre les deux épitopes (180, 228) soit spécifiquement contre l'épitope YV9V (193,48)

Les deux patients ayant généré une réponse spécifique contre l'épitope YV9V sont en échec persistant depuis plus de six mois. Une réponse spécifique contre YV9V pourrait donc nécessiter une plus longue période de réplication du virus muté. Par contre cette condition n'est pas suffisante, car les sept autres patients non contrôlés ne génèrent pas de réponse spécifique contre YV9V.

5. Modèle d'évolution de la réponse CTL contre YV9 au cours de l'infection

L'hypothèse qui nous semblait la plus vraisemblable est celle de l'influence de la charge virale sur la présence ou non d'une réponse contre YV9. En effet, les patients du groupe N présentent une charge virale plus élevée que les patients du groupe 3TC. Il est donc probable que les CTL du groupe N soient soumis à une stimulation antigénique plus importante que les CTL du groupe 3TC, ce qui génère une réponse détectable.

Par ailleurs, les charges virales des patients pour lesquels une réponse dirigée contre YV9M ou YV9V est détectée sont plus élevées (CV médiane : $4 \pm 1,6$ log copies/ml) que celles des

patients non répondeurs (CV médiane : $2,5 \pm 0,8$ log copies/ml). Mais le test de Wilcoxon donne une p-value de 0,06 indiquant ainsi que la CV n'est que marginalement corrélée avec la présence de la réponse YV9.

Néanmoins, les observations effectuées à ce stade de l'étude permettent de proposer un modèle possible de la réponse contre YV9 au cours de la progression de la maladie (figure25).

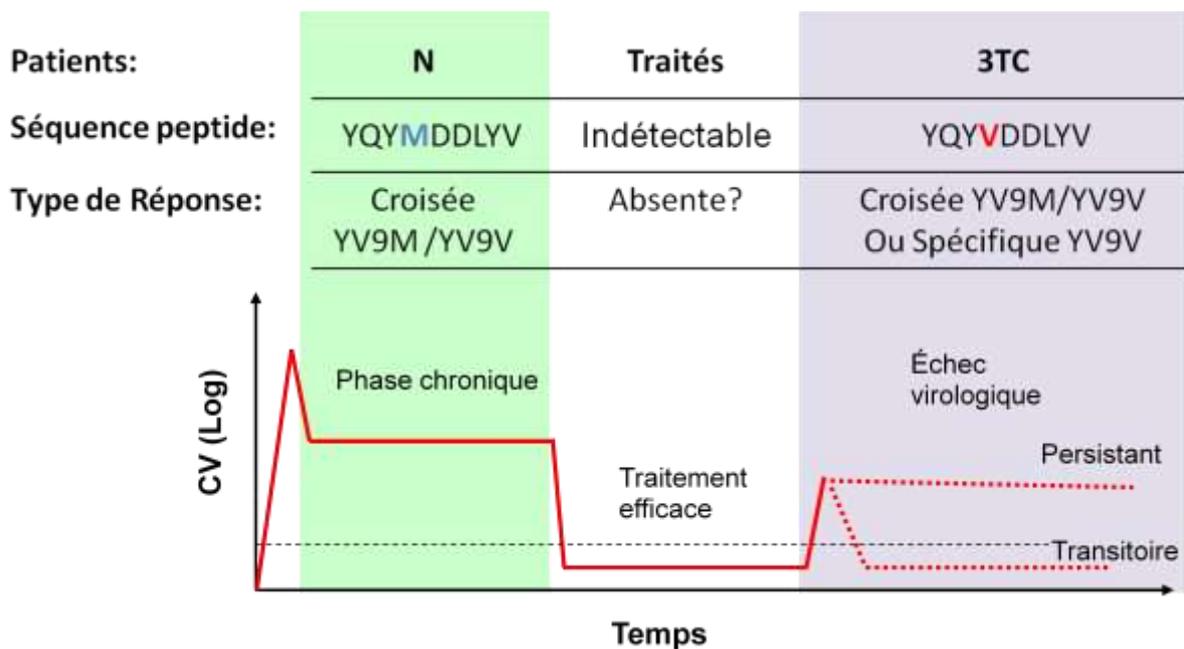


Figure 25: Modèle d'évolution de la réponse CTL contre YV9 au cours de l'infection

Les patients du groupe Non-traité sont en phase chronique d'infection et ne présentent que le virus sauvage, ils développent alors une réponse croisée contre l'épitope YV9M et YV9V avec une fréquence élevée.

Au moment de l'échec virologique deux situations sont observées: Lors d'un échec transitoire, une réponse mémoire YV9M/YV9V peut émerger, en cas d'échec persistant une réponse spécifique contre YV9V peut être alors détectée.

Pendant le temps où la charge virale est contrôlée par un traitement ART efficace, la stimulation virale est réduite. Nous émettons l'hypothèse que la réponse CTL soit absente à cette phase de l'infection.

6. Vérification du modèle établi: Études longitudinales.

Afin de confirmer le modèle proposé, il est nécessaire d'effectuer une étude longitudinale des patients au cours de leur infection. Cependant, ce type d'étude se heurte à des difficultés logistiques. En effet, l'échec virologique est rare en raison de l'efficacité de la prise en charge thérapeutique. Il faut donc inclure un nombre beaucoup plus important des patients pour pouvoir les suivre, avant le traitement, pendant la phase de succès et jusqu'à un éventuel échec virologique.

Par contre, l'évolution de la réponse CTL après initiation d'un traitement antirétroviral est plus facilement réalisable. Nous avons donc évalué les réponses avant et après le début du traitement, chez quatre patients de la cohorte (figure 26).

Les quatre patients au moment du premier prélèvement appartiennent au groupe Naïf et présentent une réponse IFN- γ contre YV9M et YV9V.

Quelques mois après leur entrée dans l'étude ils débutent un traitement antirétroviral efficace. L'étude de la réponse IFN- γ , après cette phase de contrôle virologique va nous permettre de suivre la réponse CTL en l'absence de stimulation virale.

Nous observons que trois des quatre patients testés (figures 26 A, 26 B, 26 D) présentent une réponse CTL contre YV9M et YV9V malgré une suppression efficace de la réplication virale pendant plus d'une année. Le patient 175 (figure 26 C) est le seul pour lequel la réponse ELISpot n'est pas détectée une année après le début du traitement ART.

L'hypothèse selon laquelle en absence de stimulation virale la réponse CTL serait absente, n'est donc pas validée par nos suivis longitudinaux. Il semble que même quand la réplication virale est contrôlée par le traitement ART, la réponse mémoire est conservée dans l'année qui suit le début du traitement. La charge virale ne semble donc pas être le seul facteur impliqué dans la génération de cette réponse.

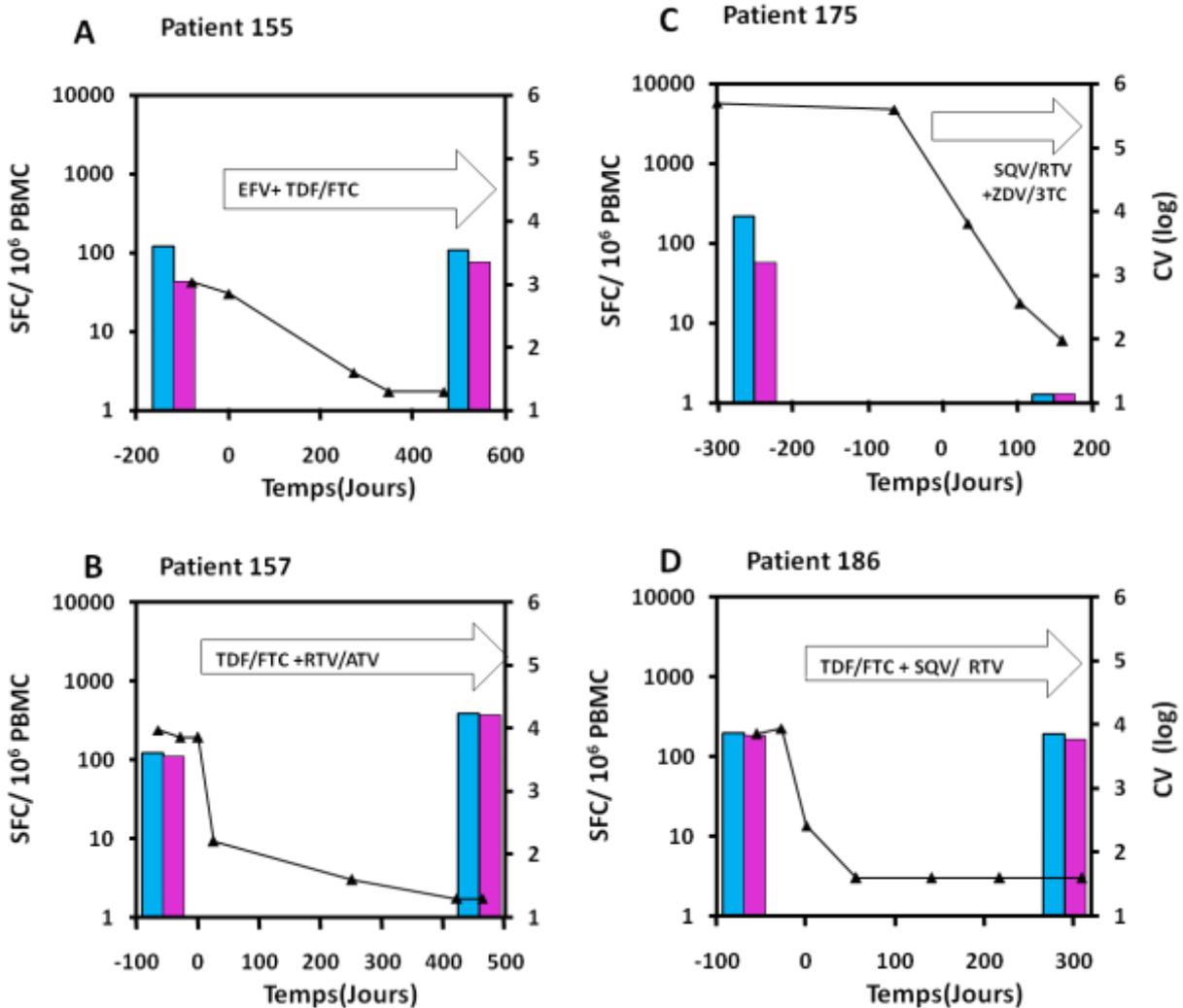


Figure 26: Comparaison de la réponse IFN- γ contre les épitopes YV9M et YV9V avant et après l'initiation du traitement

Le Jour 0 représente le début du traitement. L'association de molécules antirétrovirales utilisée pour chaque patient est précisée dans la flèches. L'évolution de la charge virale au cours du temps sont en parallèle (\blacktriangle)

La réponse IFN- γ à la stimulation est représentée par les barres bleues pour YV9M, roses pour YV9V
 (A) Patient 155. (B) Patient 157. (C) Patient 175. (D) Patient 186.

7. Rôle de la séquence virale environnante.

Une étude récente a montré que les différentes étapes du processing de l'antigène peuvent influencer l'immunodominance des épitopes CTL du VIH (Tenzer et al., 2009). De plus, plusieurs exemples de mutations d'échappement aux CTL qui touchent, non pas des acides aminés au sein de l'épitope, mais des acides aminés avoisinants ont été décrits (Draenert et al., 2004) (Milicic et al., 2005). Nous avons donc voulu approfondir l'étude de la relation existante entre le polymorphisme observé en position 177 de la RT en amont de l'épitope et la présence de la réponse IFN- γ dirigée contre l'épitope YV9.

Au sein du groupe 3TC, les RT virales des deux patients qui répondent spécifiquement à YV9V (patients 48 et 193) présentent deux polymorphismes ponctuels en amont de l'épitope (K174Q et N177E). En regardant les séquences de la RT des autres patients on observe que le polymorphisme 174 n'est pas fréquent car tous les patients du groupe N ont une lysine (K) à cette position. Par contre, en position 177 il existe un polymorphisme (N177E) assez fréquent.

L'analyse de tous les patients de la cohorte (Groupe 3TC et N confondus) montre que 7 des 8 (soit 87,5%) patients possédant une population virale «177 E» présentent une réponse IFN- γ contre YV9 alors que seulement 7 sur 24 (soit 29%) des patients avec une séquence virale 177 (D ou N) ont une réponse IFN- γ positive contre cet épitope ($p < 0,001$, test exact de Fisher) (figure 27).

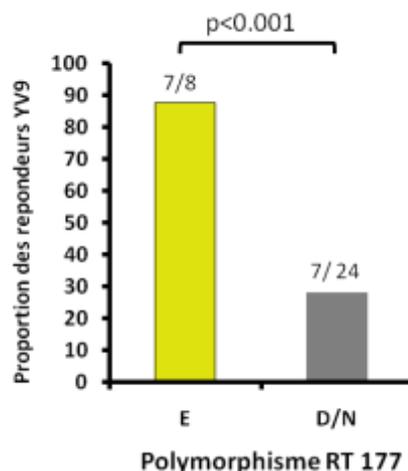


Figure 27: Proportions de réponses YV9 des patients porteur d'un virus 177E ou 177D/N de la RT

8. Analyse Multivariée

Pour prendre en compte les différentes observations et les données collectées lors de cette étude nous avons effectué une analyse multivariée pour définir l'impact de chaque paramètre virologique, immunologique étudié dans l'émergence de la réponse YV9.

La stratégie choisie pour faire cette analyse multivariée est d'inclure toutes les variables explicatives et d'effectuer une régression logistique afin de déterminer quelles sont les variables impliquées dans la présence de la réponse YV9 et d'éliminer successivement celles qui semblent être les moins impliquées. Les variables étudiées sont: la valeur absolue de CD4 au moment du prélèvement, le nadir CD4, la valeur de la charge virale plasmatique, le pourcentage d'activation des lymphocytes CD8+, le pourcentage de CD8 différenciés, le niveau d'épuisement des cellules T CD8⁺, le groupe (3TC ou N), la présence de l'acide aminé E en position 177 (Tableau X).

La présence de l'acide glutamique en position 177 apparaît comme la variable la plus fortement corrélée avec la génération de la réponse YV9. Parmi les autres variables, seule la charge virale est corrélée avec la génération d'une réponse IFN- γ détectable contre l'épitope YV9.

Tableau X: Résultats des analyses multivariées successives évaluant les variables impliquées dans la génération d'une réponse contre YV9

- Les tableaux de A à F représentent les résultats statistiques des analyses multivariées établissant la relation entre les différentes variables explicatives et la présence de la réponse ELISpot contre YV9.

Le tableau A représente l'analyse incluant toutes les variables explicatives connues. La variable la moins influente dans la génération de la réponse est identifiée (p-value la plus élevée, en gris dans le tableau)

Les tableaux B à G représentent les analyses multivariées successives, à chaque nouvelle analyse la variable la moins influente est exclue

- **Les variables explicatives étudiées:** Charge virale (CV), taux de lymphocytes CD4 (CD4), nadir CD4, pourcentage de lymphocytes CD8⁺ activés (%CD8⁺ 38⁺ DR⁺), pourcentage de lymphocytes CD8 différenciés (CD8⁺ 27⁻ 28⁻), expression du marqueur d'épuisement PD1, le groupe N ou 3TC et la présence de l'acide aminé E dans la position 177 de la RT.

A	Variable	p-value	D	Variable	p-value
	CD4	0.4945		CV	0.1899
	CV	0.2109		Nadir CD4	0.4563
	Nadir CD4	0.4353		PD1	0.1274
	% CD8 ⁺ 38 ⁺ DR ⁺	0.8473		Groupe	0.3978
	% CD8 ⁺ 27 ⁻ 28 ⁻	0.7209		177 E	0.0634
	PD1	0.3004	E	Variable	p-value
	Groupe	0.3332		CV	0.1305
	177 E	0.0987		PD1	0,1187
				Groupe	0.5600
				177 E	0.0245
B	Variable	p-value	F	Variable	P-value
	CD4	0.5061		CV	0.073
	CV	0.1990		PD1	0.128
	Nadir CD4	0.3226		177 E	0.0217
	% CD8 ⁺ 27 ⁻ 28 ⁻	0.7494			
	PD1	0.2185	G	Variable	p-value
	Groupe	0.3089		CV	0.06
	177 E	0.0632		177 E	0.01
C	Variable	p-value			
	CD4	0.5339			
	CV	0.1929			
	Nadir CD4	0.3538			
	PD1	0.1273			
	Groupe	0.3322			
	177 E	0.0670			

9. Réponse YV9 asymétrique?

a) Hypothèse : Acide aminé en position 4 impliqué dans le contact TCR-épitope.

Une autre question soulevée par ces travaux est le caractère asymétrique de la réactivité croisée de la réponse spécifique de YV9. En effet, chez les patients du groupe N la réponse dirigée contre YV9M croise systématiquement avec l'épitope mutant YV9V, alors que deux patients du groupe 3TC reconnaissent uniquement l'épitope YV9V. Ces observations impliquent que si le peptide immunogène est le YQYMDDLIV la réponse est capable de croiser avec YV9V mais si l'épitope immunogène est le YQYVDDLIV la réponse ne croisera pas avec le peptide sauvage.

Puisque la méthionine est plus grande que la valine il est donc possible qu'un TCR capable de reconnaître YV9M soit capable d'accepter le peptide YV9V mais que l'inverse ne soit pas vrai car la méthionine de l'épitope sauvage occasionnerait un gêne stérique empêchant le TCR de se fixer (figure 28)

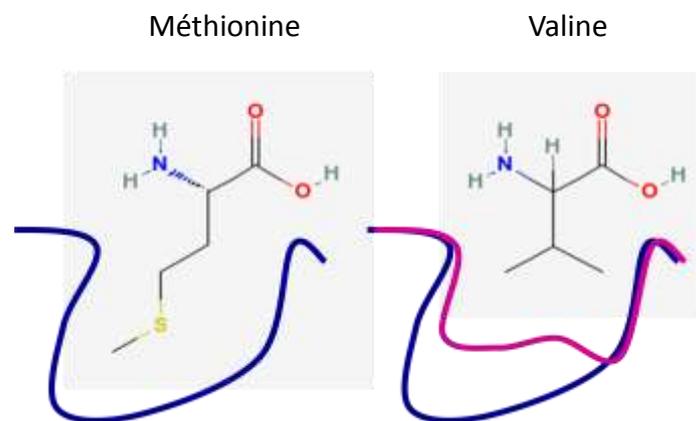


Figure 28: Modèle du contact TCR-acide aminé en position 4 de l'épitope YV9 (méthionine ou valine)

b) Réponse IFN- γ de deux clones CTL à différentes variantes de YV9.

Pour évaluer la validité de cette hypothèse, nous avons d'abord testé deux clones isolés: le premier à partir des PBMC du patient 181 du groupe N qui répondait à YV9M et YV9V et l'autre à partir des PBMC du patient 193 du groupe 3TC répondant spécifiquement à YV9V. La figure 29 montre la réponse IFN- γ mesurée par ELISpot de ces clones à sept peptides différents pour lesquels l'acide aminé en position 4 a été permuté. Le choix des différents acides aminés en position 4 du nonamère permettra de tester notre hypothèse :

Si la chaîne latérale en position 4 doit être hydrophobe pour pouvoir être reconnue alors le fait de l'éliminer entièrement en plaçant une glycine (G, acide aminé sans chaîne latérale) ou le fait de substituer une méthionine (M) par un acide aspartique (D, acide aminé chargé) devrait avoir une conséquence visible sur la réponse détectée.

Les peptides YV9 ayant en position 4 des acides aminés à chaînes latérales petites et hydrophobes (V, A, I) devraient être reconnus par tous les TCR.

Les acides aminés ayant une chaîne latérale encombrante (M, F) ne seront probablement reconnus que par les clones spécifiques de YV9M.

Le résultat de la plaque ELISpot (figure 29) montre que le clone isolé à partir des PBMC du patient du groupe N a un spectre large de reconnaissance : Une réponse IFN- γ positive est observée pour 184 V et 184M mais aussi pour 184I, 184A, 184G, 184F et 184D.

En revanche, pour le clone spécifique de 184V, une réponse IFN- γ n'a été mesurée qu'avec YV9V et YV9I et l'intensité de la réponse contre YV9I est faible.

Deux profils de reconnaissance opposés sont ainsi observés; d'une part pour le clone spécifique de YV9M il semblerait que la position 4 ne soit pas impliquée dans les contacts TCR-peptides, à l'inverse pour le clone YV9V la position P4 du peptide semble très importante dans sa reconnaissance par le TCR, indiquant que cette position soit directement impliquée dans le contact avec le TCR.

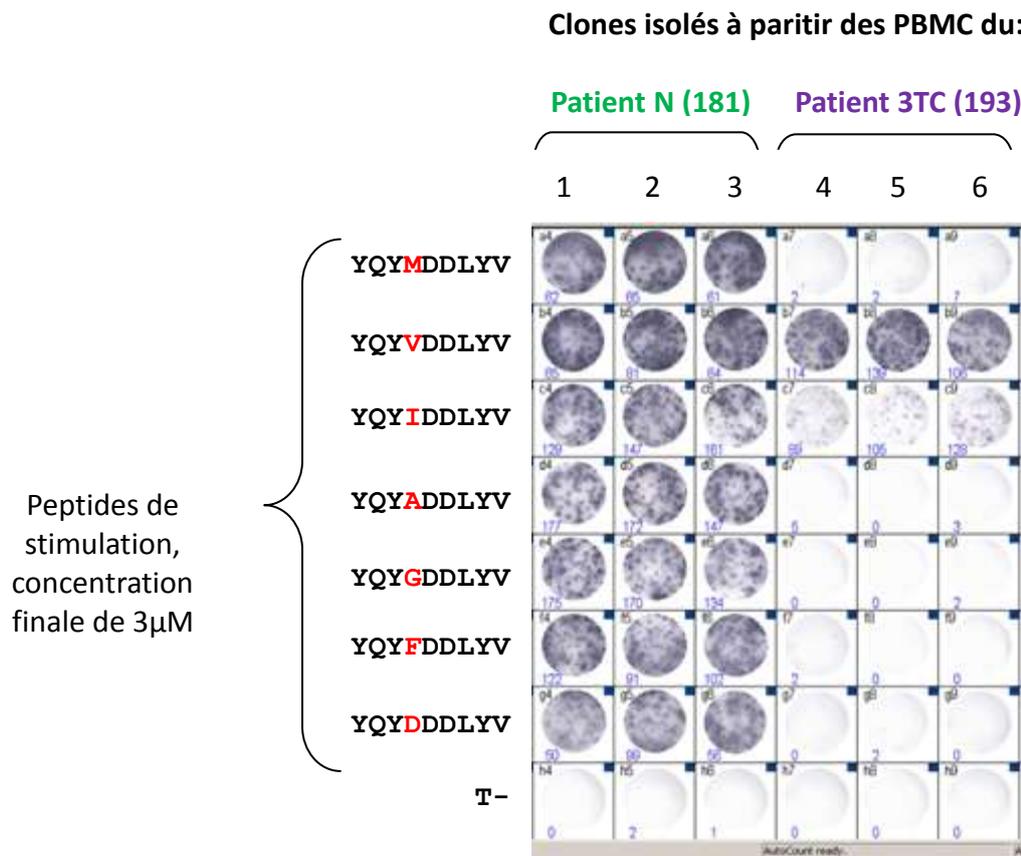


Figure 29: Réponse IFN- γ mesurée par ELISpot des clones spécifiques de YV9M ou YV9V

Les colonnes 1, 2 et 3 représentent la réponse IFN- γ d'un clone isolé à partir des PBMC du patient 181 du groupe N (triplicate). Les colonnes 4, 5 et 6 représentent la réponse IFN- γ du clone isolé à partir des PBMC du patient 193 du groupe 3TC (triplicate).

Chaque ligne correspond à un peptide de stimulation, seul l'acide aminé en position 4 varie d'un peptide à l'autre et il est indiqué en rouge.

c) Avidité fonctionnelle des lignées CTL contre les variantes de YV9

Pour approfondir davantage ces observations, nous avons évalué l'avidité fonctionnelle, contre les sept variantes du peptide, de 5 lignées CTL isolées à partir des PBMC des patients (trois patients du groupe N et deux du groupe 3TC) ainsi que du clone spécifique de YV9M (figure 30).

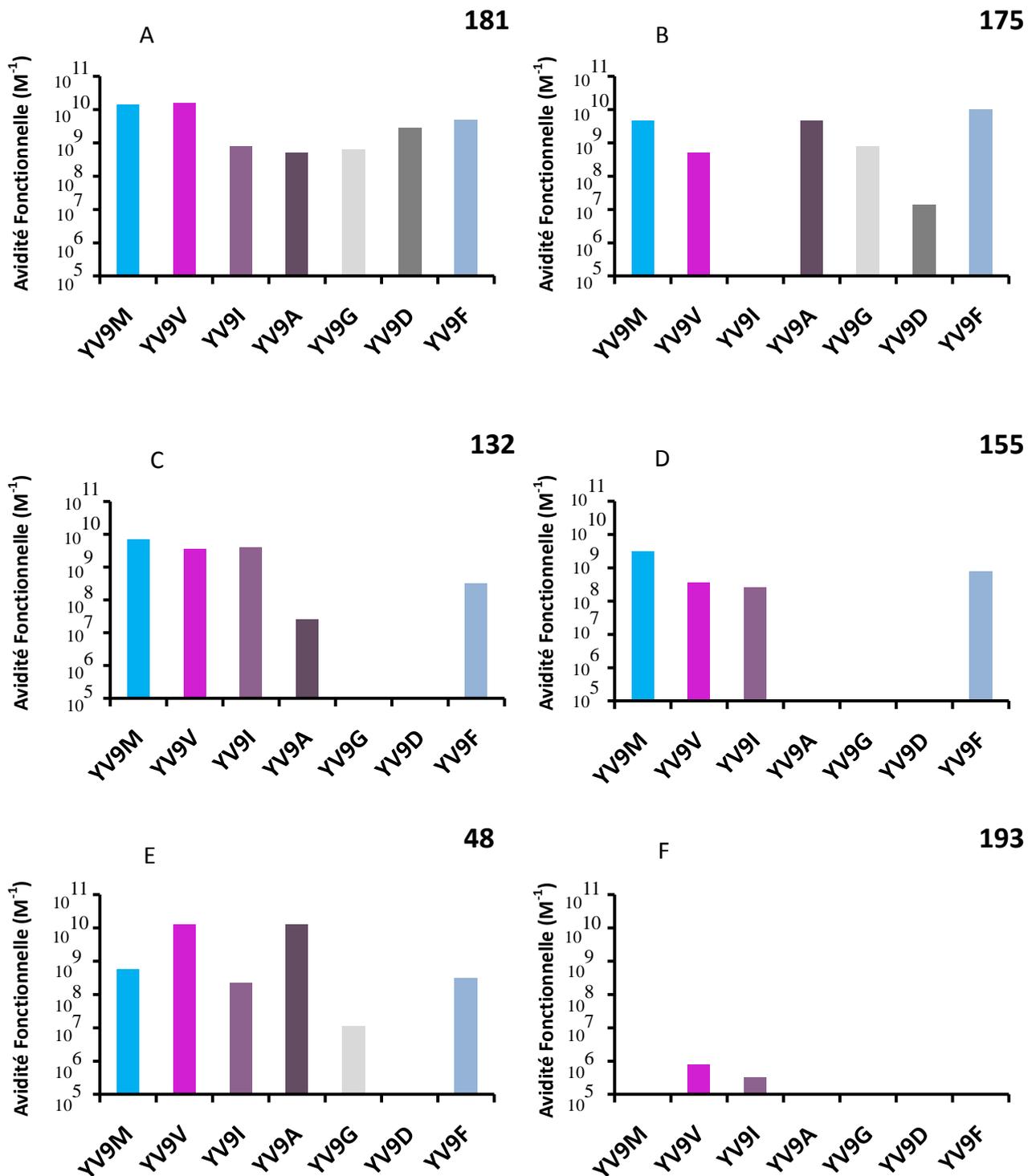


Figure 30: Avidités fonctionnelles du clone 8D10 et des lignées CTL, contre sept variantes de YV9 ayant un acide aminé différent en position 4.

A: Clone issu des PBMC du patient 181 du groupe N

B, C, D: Lignées CTL issues des PBMC des patients 132, 175 et 155 du groupe N

E F: Lignées CTL issues des PBMC des patients 48 et 193 du groupe 3TC

Les valeurs des avidités fonctionnelles calculées peuvent être arbitrairement classées en trois catégories :

Forte : 10^9 M^{-1} à 10^{11} M^{-1}

Moyenne : 10^6 M^{-1} à 10^8 M^{-1}

Faible : Inférieur à 10^6 M^{-1}

Nos résultats ne permettent pas de dégager une conclusion définitive car différents profils de réponse ont été obtenus :

-Le clone isolé à partir des PBMC du patient 181 montre un cas extrême de reconnaissance croisée, il est capable de reconnaître tous les peptides avec des avidités fonctionnelles fortes. Dans ce cas précis le TCR est indifférent à la modification de l'acide aminé en position 4 (Figure 30 A).

-Les lignées CTL 155 (figure 30 C) et 132 (figure 30 D) du groupe N présentent un autre profil de reconnaissance. Ces CTL reconnaissent YV9M, YV9V, YV9I et YV9F avec une avidité fonctionnelle forte par contre ils ne reconnaissent pas ou faiblement les peptides ayant les acides aminés A, G ou D en position 4 indiquant peut être que le TCR n'accepte ni des acides aminés positivement chargés (D), ni les non hydrophobes (A et G). Dans ce cas la position 4 de l'épitope semble impliquée dans la reconnaissance TCR-peptide.

-La lignée 175 (figure 30 B) est le profil le plus difficilement compréhensible. Il reconnaît YV9M et YV9V et YV9F avec une avidité forte de la même manière que les lignées 132 et 155. Cependant, la lignée 175 reconnaît aussi YV9 D avec une avidité moyenne, indiquant que son TCR est le seul parmi les lignées testées à accepter un acide aminé chargé en P4. De la même manière il reconnaît YV9A et YV9G avec des avidités fonctionnelles fortes montrant qu'il accepte aussi des peptides ayant des acides aminés de petite taille en position 4. Mais, au contraire des autres lignées CTL, il ne reconnaît pas YV9I. Dans ce cas l'acide aminé en position 4 est impliqué dans le contact YV9-TCR, mais la manière avec laquelle le contact se produit ne ressemble pas à celle observée pour les lignées CTL des patients 132 et 155.

-Concernant la lignée du patient 48 (figure 30 E) du groupe 3TC, il y a comme attendu, une reconnaissance préférentielle pour les chaînes latérales petites V et A. Même si les acides aminés ayant des grandes chaînes latérales sont reconnus (M et F), l'avidité fonctionnelle est moins forte. La lignée 48 ne reconnaît pas ou reconnaît peu YV9G et YV9D ce qui montre que

ni les acides aminés chargés ni ceux sans chaîne latérale ne sont acceptés.

-Pour la lignée du patients 193 (figure 30 F) on constate une extrême sélectivité pour YV9V qui est liée à sa faible avidité fonctionnelle. En effet on ne peut pas dire si YV9M est moins bien reconnu que YV9A ou YV9D car l'avidité fonctionnelle est trop faible pour pouvoir être calculée.

Nos résultats montrent que même si la nature de l'acide aminé à la position 4 du peptide immunogène semble être importante pour sa reconnaissance, il est difficile de définir la manière dont elle l'influence.

Ces observations soulignent la difficulté à mesurer l'influence d'une mutation ponctuelle au sein d'un épitope sur l'intensité de la réponse CTL. En effet, nous observons que pour six patients étudiés, il ressort quatre profils de reconnaissance différents.

D. Discussion

1. Identification de l'épitope le plus fréquemment reconnu.

La région au sein de laquelle se trouve la mutation M184V a été d'un grand intérêt pour les recherches immunothérapeutiques car elle se trouve au sein du motif YMDD, un motif fortement conservé dans les séquences des transcriptases inverses des différents rétrovirus. C'est donc dans ce but immunothérapeutique l'équipe de Bruce Walker en 1996 (Harrer et al., 1996) a isolé à partir d'un patient non progresseur à long terme, une lignée CTL reconnaissant un épitope restreint par HLA-A2 contenant le motif YMDD et la mutation M184V se localisant à la position 179-187 de la RT : le VL9.

Cependant cet épitope n'est que rarement reconnu chez les patients HLA-A2⁺. Par exemple, dans une étude datant de 2005, parmi 51 patients HLA-A2⁺ testés, seulement un reconnaissait le VL9 (Schmitt-Haendle et al., 2005). Malgré ceci, l'épitope VL9 a été proposé comme un candidat pour une immunothérapie dans plusieurs études :

- Deux études suggèrent le VL9 comme un bon antigène pour un vaccin thérapeutique visant à induire une réponse CTL capable de retarder ou empêcher l'échec virologique sous 3TC (Schmitt et al., 2000) (Okazaki et al., 2006)
- Une autre étude, montre que la transfection des cellules COS par un vecteur codant pour les molécules du CMHI couplées avec les séquences des épitopes subdominants, provoque *in vitro* une réponse CTL forte et spécifique contre ces épitopes. Un des épitopes subdominants utilisés dans ce modèle est le VL9 (Dela Cruz et al., 2000).

Un deuxième épitope, le YV9, contenant cette mutation M184V restreint HLA-A2 a été décrit dans la littérature (Samri et al., 2000). La prédiction de l'épitope s'est fait grâce à un outil informatique (www.bimas.cit.nih.gov) capable d'identifier les possibles épitopes CTL en fonction du HLA et de la séquence peptidique. L'épitope YV9 (181-189) restreint par le HLA-A2 est proposé comme un épitope CTL. Lors de cette même étude deux patients HLA-A2 sont testés dont seulement un reconnaît YV9M et YV9V avec des intensités de réponse IFN- γ comparables. Dans notre cohorte de patients aucune réponse n'est détectée contre VL9, alors que l'épitope YV9 est reconnu par 14 patients des 34 testés. L'épitope YV9 est donc l'épitope optimal. Pour des prochaines approches immunothérapeutiques contre ce motif conservé de la RT il serait donc judicieux de l'utiliser comme candidat.

2. Facteurs impliqués dans la génération d'une réponse spécifique contre YV9

Lors de cette étude nous avons observé que la fréquence des réponses IFN- γ contre YV9M est significativement inférieure dans le groupe en échec virologique comparé au groupe de patients non traités. Une étude antérieure avait observé une fréquence augmentée de la réponse CTL contre l'épitope PR76-84 chez des patients porteurs des virus mutés résistants aux IP comparés à des patients porteurs du virus sauvage (Karlsson et al., 2003). Nos travaux ne confirment pas ces résultats et montrent que les observations effectuées pour un épitope ne pourront pas être généralisées.

Cependant, nos résultats sont particuliers, car nous avons montré que la mutation M184V n'est pas une mutation d'échappement aux CTL, il est alors difficile d'expliquer la fréquence de reconnaissance faible de cet épitope au sein du groupe en échec virologique.

Sur ce point, l'analyse multivariée nous apporte quelques éléments permettant de comprendre ces résultats. Il apparaît que le facteur le plus significativement associé à la génération d'une réponse CTL contre YV9 est la présence d'un acide glutamique en aval de l'épitope (position 177). La charge virale au moment de l'inclusion semble également impliquée dans la présence de réponse mais dans une moindre mesure.

Comment la séquence environnante de l'épitope peut-elle influencer la réponse CTL contre celui-ci?

Plusieurs études de la littérature démontrent que les mutations au sein des séquences avoisinantes des épitopes peuvent influencer leur processing et présentation, et donc éviter la réponse CTL (Theobald et al., 1998)(Yokomaku et al., 2004) (Milicic et al., 2005)(Zimbwa et al., 2007). Par exemple, dans un travail réalisé en 2007 (Zimbwa et al. 2007) il est mis en évidence qu'une simple mutation E169D de la RT du VIH située cinq acides aminés en aval d'un épitope CTL restreint par le HLA-B07 (SM9 position 156-164 de la RT) peut réduire sa présentation de façon drastique.

Une hypothèse est donc que l'on se trouve face à ce type de situation. Dans notre étude l'acide aminé en position 177 serait impliqué dans le processing de l'épitope YV9 par le protéasome ou d'autres peptidases cytosoliques. La présence d'un acide Glutamique en position 177 de la RT pourrait alors favoriser son processing. La présence d'un autre acide aminé différent (D ou N), au contraire rend le processing moins efficace.

La quantité d'épitope présenté semble alors le facteur essentiel pour générer une réponse contre YV9. Elle pourrait être influencée de deux manières différentes :

- Si la charge virale est contrôlée, seuls les patients porteurs d'un virus ayant un acide aminé E en position 177, et donc un processing efficace, pourront développer une réponse IFN- γ contre YV9
- D'autre part si le processing de la protéine est inefficace (acide aminé D ou N en 177), seuls les patients ayant une charge virale élevée pourront obtenir les concentrations en épitope nécessaires pour générer la réponse CTL.

Le tableau XI représente la probabilité d'obtenir une réponse en fonction de la nature de l'acide aminé 177 et de la charge virale.

Tableau XI : Probabilité d'obtenir une réponse contre YV9 en fonction de l'acide aminé en position 177 et la charge virale.

CV \ A.A 177	E	D ou N
Forte	+++	--+
Faible	++-	---

Dans le groupe des patients non traités, les deux conditions sont réunies, la charge virale est élevée et le 177E est assez fréquent. **L'épitope YV9 est donc reconnu de manière fréquente au sein du groupe N.**

Au contraire, pour les patients 3TC la charge virale est significativement inférieure à celle du groupe Naïf et l'acide glutamique en position 177 n'est présent que pour deux patients. **Il est donc normal que la réponse dirigée contre l'épitope YV9 détectée soit rare.**

Les études longitudinales sur la réponse CTL avant et après début du traitement ART sont aussi en cohérence avec cette observation. En effet, les trois patients (155, 157, 186) pour lesquels la réponse CTL reste détectable une année après le contrôle de la réplication virale, possèdent tous un virus 177E. Alors que le patient (175) pour lequel la réponse contre YV9 disparaît présente une séquence virale 177D.

Même si cette idée semble cohérente, et permet de rendre compte de l'ensemble de nos résultats, des expériences supplémentaires sont nécessaires pour pouvoir émettre une conclusion définitive. Elles doivent explorer la relation existant entre la présence de l'acide aminé en position 177 et le processing et la présentation de l'épitope YV9 doivent être effectuées.

Un travail récent (Tenzer et al., 2009) a décrit comment le processing de Gag peut influencer la quantité d'épitopes présentés aux CTL et modifier ainsi leur immunodominance. Si nos hypothèses s'avéraient exactes elles seraient alors la confirmation clinique des études biochimiques de Tenzer et al.

Ces considérations peuvent contribuer à comprendre pourquoi certains patients génèrent une réponse contre des épitopes subdominants alors que d'autres n'en génèrent pas.

3. Reconnaissance de l'épitope par le TCR.

En accord avec plusieurs cas de réponses CTL qui croisent avec les épitopes mutés décrits auparavant (Lee et al., 2004) (Lin et al., 2005) (Mueller et al., 2007) nous montrons ici que les patients du groupe Naïf (groupe contrôle) développent de manière fréquente une réponse CTL contre l'épitope YV9M qui croise avec YV9V. Ceci est aussi en cohérence avec l'observation effectuée chez un patient pour lequel la mutation M184V ne modifiait pas la reconnaissance CTL de l'épitope YV9 (Samri et al., 2000). De façon générale, la reconnaissance des épitopes par des TCR est dégénérée et il a été calculé qu'un TCR spécifique d'un épitope est capable de reconnaître jusqu'à 10^6 variantes d'un épitope (Wucherpfennig, 2004).

Il n'est donc pas surprenant que les CTL spécifiques pour YV9M reconnaissent aussi YV9V.

Cependant, le fait que deux patients (48 et 193) appartenant au groupe 3TC répondent spécifiquement à YV9V et ne reconnaissent pas YV9M, évoque un cas de cross réactivité unidirectionnelle : Si les CTL sont « primés » avec YV9M la réponse serait cross-réactive ; au contraire, si le « prime » se fait avec YV9V la réponse ne croiserait pas avec YV9M.

Peu de cas de ce phénomène de cross-réactivité unidirectionnelle ont été décrits :

Dans une étude chez la souris, la vaccination avec le peptide TEMEKEGKI induit une réponse CTL qui croise avec le peptide muté TEMEAEGKI. Par contre, la vaccination avec le peptide muté induit des CTL spécifiques de celui-ci, incapables de réagir contre le peptide d'origine

TEMEKEGKI (Leggatt et al., 1998). Un résultat semblable a été décrit chez des souris immunisées par des variants d'un épitope de Nef en 2002 (Boissonnas et al., 2002).

Chez l'Homme un seul exemple de réactivité croisée unidirectionnelle a été mis en évidence en 2009 pour l'épitope TL9 de Gag. Chez les patients HLA-B81⁺ la réponse CTL provoquée par la stimulation du sous-type C du VIH cross réagit avec la séquence de l'épitope des virus de sous-type A. Par contre, chez des patients infectés d'un virus de sous-type A, les CTL spécifiques de l'épitope TL9 sont incapables de cross réagir avec la variante du sous-type C (Geldmacher et al., 2009)

Dans ce travail nous avons donc voulu approfondir l'étude sur la cross-réactivité de la réponse contre YV9 pour évaluer à quel point la cross-réactivité asymétrique était stricte. Nous avons observé deux cas extrêmes :

- Le clone 8D10 qui reconnaît les sept peptides avec une avidité fonctionnelle forte pour tous les variants (de l'ordre de 10^9 - 10^{10} M⁻¹).
- La lignée CTL du patient en échec virologique 193 qui reconnaît exclusivement le peptide YV9V avec une avidité fonctionnelle faible (10^5 - 10^6 M⁻¹).

Entre les deux cas extrêmes plusieurs profils de reconnaissance propre à chaque lignée CTL ont été observés.

Chez les patients que nous avons étudiés, le répertoire TCR et le sous-type HLA sont potentiellement variables, et ces deux facteurs influencent les profils de réactivité croisée observés chez l'Homme (Geldmacher et al., 2009). Dans le modèle murin, l'utilisation des souris génétiquement identiques et d'antigènes invariants, comme des peptides synthétiques, élimine ces sources de variabilité et facilite l'observation des cas de réactivité croisée unidirectionnelle. Il semble donc probable que des exemples de réactivité croisée asymétrique existent chez l'Homme, mais seraient restreints à certaines combinaisons de peptide immunogène et sous-type HLA.

E. Conclusion et perspectives

- La question initiale était de savoir si la réponse YV9 jouait un rôle sur les virus porteurs de la mutation M184V. Dans notre cohorte, la fréquence de reconnaissance de l'épitope YV9 chez les patients en échec virologique sous 3TC est très faible. On peut donc penser que cette réponse ne limite pas la réplication des virus résistants.
- Il serait intéressant d'étudier la capacité antivirale des clones et lignées spécifiques de YV9 *in vitro* pour évaluer le potentiel de cette réponse dans le contrôle de la charge virale et dans l'avènement des échecs virologiques.

Induire une réponse CTL efficace contre cette région de la RT en coordination avec la pression d'un traitement comportant de la 3TC ou de la FTC pourrait être une manière d'assurer le contrôle prolongé de la réplication virale. Ceci serait être particulièrement utile dans les pays où les molécules antirétrovirales disponibles sont restreintes, et où il n'existe pas ou peu de stratégies alternatives visant à maintenir l'efficacité de la première ligne de traitement.

- En terme de valorisation, le clone 8D10 spécifique de YV9 obtenu lors de ce travail a été transmis dans le cadre d'un MTA (Accord de Transfert de Matériel) avec l'université de Nantes à l'entreprise « Adaptimmune » (Oxford, RU), spécialisée dans l'immunothérapie. Leur objectif est de générer des CTL autologues transfectés par des séquences TCR ayant une forte avidité pour les épitopes du VIH. Actuellement, ils s'intéressent au TCR du clone 8D10 à partir duquel un TCR de très haute affinité sera produit, pour une éventuelle immunothérapie contre YV9.
- L'influence des polymorphismes de séquence à proximité de l'épitope sur son processing et présentation est un point à prendre en compte lors du développement d'une stratégie vaccinale. Il sera donc nécessaire d'étudier directement le rôle des différents polymorphismes en amont de l'épitope YV9 dans la présentation de l'épitope aux CTL spécifique de YV9.

IV. Effet de L'IL-15 et de son super-agoniste (RLI) sur la prolifération des lymphocytes T chez des patients VIH⁺ comparaison avec L'IL-2 et L'IL-7

A. Objectif

Différentes approches thérapeutiques concernant les cytokines de la famille de la chaîne γ commune ont été développées dans le but de restaurer l'immunocompétence des patients qui, malgré une réplication virale contrôlée, ne parviennent pas à obtenir un taux de CD4 normal.

L'IL-2 a été la première cytokine à être étudiée dans ce contexte, mais les résultats des études cliniques récentes (Abrams et al., 2009) montrent que l'utilisation de l'IL-2 n'apporte pas de bénéfice clinique dans le cadre de l'infection à VIH. Comme évoqué précédemment ce résultat décevant est probablement dû aux types des cellules cibles de l'IL-2, en particulier la prolifération des cellules de types T régulatrices (Weiss et al., 2010)

Dans le but de chercher des traitements capables d'induire une récupération des populations cellulaires apportant des bénéfices immunologiques, les chercheurs se sont tournés vers d'autres cytokines.

Dans notre étude nous nous sommes focalisés particulièrement sur l'IL-15 et l'IL-7.

L'IL-15 est une interleukine intéressante non seulement par ses effets sur les lymphocytes CD8⁺ et les cellules NK, qui peuvent contribuer à potentialiser les réponses antivirales innée et adaptative, mais également par son rôle probable sur les sous-populations CD4⁺ mémoires (Picker et al., 2006) Comme la voie de signalisation de l'IL-15 est activée par une transprésentation du complexe APC-IL-15R α à la cellule cible, l'équipe de Y Jacques (Mortier et al., 2006) a synthétisé un super agoniste de l'IL-15 qui consiste en une protéine de fusion soluble constituée du domaine sushi de la chaîne α du récepteur couplée à un linker de 20 acides aminés et avec l'IL-15 native dans l'extrémité C terminal appelé le RLI (figure 31).

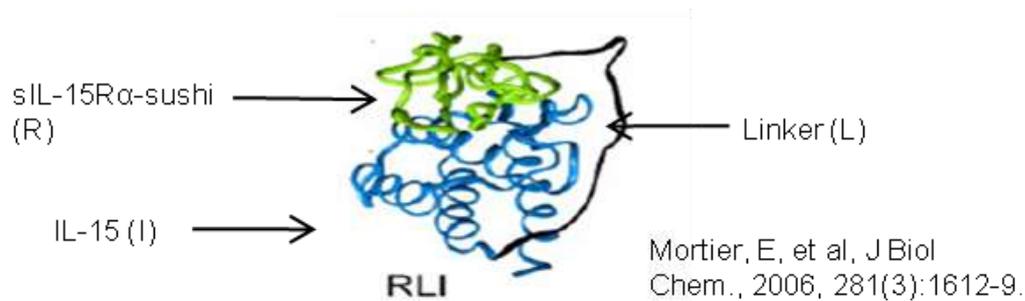


Figure 31: Structure du super agoniste de l'IL-15 (RLI)

Par ailleurs, l'IL-7 a donné des résultats très prometteurs en termes de reconstitution du compartiment CD4 (Sereti et al., 2009) (Levy et al., 2009), mais les observations de différentes équipes laissent penser que l'immunothérapie par l'IL-7 pourrait s'avérer sous-optimale pour les patients virémiques (Benito et al., 2005) (Camargo et al., 2009) (Juffroy et al., 2010)

L'objectif majeur de ce travail est de comparer les effets prolifératif et anti-apoptotique des interleukines IL-2, IL-7 et IL-15, et du superagoniste de l'IL-15, le RLI, sur les PBMC des patients VIH⁺.

Nous avons comparé la réponse aux différentes interleukines chez deux groupes de patients : les CD4 « High » (hi), ayant un taux de CD4 proche des valeurs normales, et les CD4 « low » (lo) ayant un taux faible de CD4 ainsi qu'un groupe témoin de donneurs VIH négatifs, pour évaluer dans quelle mesure la réponse fonctionnelle aux interleukines est corrélée avec le stade de la maladie.

En outre, nous avons étudié l'action de chaque molécule sur les différentes sous-populations des lymphocytes T CD4⁺.

Cette étude fait l'objet d'un article rédigé et prochainement soumis (Annexe 2)

B. Patients et Méthodes

1. Patients

Dans cette étude nous avons au total recrutés 30 patients VIH⁺ naïfs de traitement antirétroviral respectant les critères d'inclusions suivants :

- **CD4Hi (n=22, médiane CD4/mm³=593, médiane CV=4.3 log₁₀ copies/ml):**

Patients naïfs de traitement antirétroviral, séropositifs depuis au moins 3 ans, avec une baisse du taux de lymphocytes T CD4⁺ inférieur à 300/mm³ au cours des 3 dernières années, *ou* ayant un taux de lymphocytes T CD4⁺ à l'inclusion supérieur à 500 /mm³.

- **CD4Lo (n=7, médiane CD4/mm³=149, médiane CV=5.5 log₁₀ copies/ml):**

1) Patients Naïfs de traitement antirétroviral, présentant une diminution du taux de lymphocytes T CD4⁺ supérieur à 300/mm³ (3 dernières années);

2) Patients avec un taux de CD4⁺ inférieur à 200/mm³ à la présentation initiale;

Un consentement éclairé a été signé par tous les patients participants à cette étude. Les patients sont suivis au CHU Hôtel Dieu de Nantes, et le taux de lymphocytes CD4⁺, ainsi que la valeur de la charge virale sont mesurés dans le cadre de leur suivi médical.

- Nous avons recrutés 12 donneurs VIH négatifs comme **Groupe contrôle** le sang a été obtenu dans le cadre d'une convention signée avec l'EFS de Nantes

En raison d'un volume de sang limité pour chaque patient, toutes les expériences n'ont pas pu être réalisées à chaque fois pour chaque patient, ce qui explique le nombre variable d'échantillons analysés à chaque expérience.

2. Préparation des PBMC

Les Cellules mononuclées des patients ont été isolées à partir de 18ml de sang total par patient. Après séparation par gradient de densité sur Ficoll. dix millions de cellules fraîches sont utilisées pour effectuer les études de prolifération et d'apoptose et les cellules supplémentaires sont cryopréservées dans 50% SVF, 40%RPMI, 10% DMSO et stockées dans l'azote liquide.

3. Culture cellulaire et stimulation par les cytokines

Dans une plaque à 96 puits à fond plat, les $1,5 \times 10^5$ PBMC isolées sont cultivées dans du milieu de culture (Milieu RPMI 1640 supplémenté avec Glutamine Pénicilline et Streptomycine et 10%SVF) seul ou en présence des différentes cytokines à 37°C et 5%CO₂.

Les différentes conditions testées sont les suivantes

- IL-2 (Proleukin®, CHIRON, France) à une concentration finale de 1nM (250 U/ml).

-IL-7 à une concentration finale de 1nM (17ng/ml) (Recombinant Human IL-7, Peprotech Inc. Rocky Hill, NJ).

IL-15 (Recombinant Human IL-15, Peprotech Inc, Rocky Hill, NJ), à différentes concentrations finales : 1nM (13ng/ml), 0,3nM, 0,1nM.

RLI (Fourni par l'équipe INSERM U892 équipe Cytokines et Récepteurs, Nantes, France) à différentes concentrations : 1nM (20ng/ml), 0,3nM, 0,1nM.

4. Purification des lymphocytes T

La purification des cellules T à partir des PBMC des patients est effectuée grâce à un kit de séparation par billes magnétiques sur colonne (Pan T cell Isolation Kit II, Miltenyi Biotec Bergisch Gladbach, Allemagne). La séparation se fait en suivant les instructions du fabricant. Les PBMC des patients sont lavées trois fois avec un tampon de lavage (PBS-2mMEDTA) et marquées par un cocktail d'anticorps biotinylés qui vont se fixer à l'ensemble des cellules non-T: Cellules B, cellules NK, Cellules dendritiques, Monocytes Granulocytes et Érythrocytes (Anticorps anti CD16, CD19, CD56, CD123, CD14 et anti-Glycophorin A). Après incubation avec le cocktail d'anticorps, la séparation des cellules T et non T se fait sur colonne par billes magnétiques (LD-Columns Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Allemagne). L'effluent récupéré contient des lymphocytes isolés. Pour vérifier que l'étape de purification a été efficace on marque les PBMC avant et après purification par un anticorps anti CD3-FITC. Les cellules marquées sont analysées par cytométrie en flux.

5. Analyse de l'apoptose

Trois jours après la mise en culture des cellules stimulées par les différentes cytokines, 10^5 cellules sont prélevées pour effectuer l'analyse du niveau d'apoptose spontanée

Les cellules sont incubées 30 minutes à température ambiante, à l'abri de la lumière en présence de :

- Anticorps anti-CD4-PeCy (Clone : SK3, BDBiosciences, San José, EU)
- Anti-CD8-APC (Clone : RPA-T8, BDBioscience, San José, EU)
- 3 μ l d'Annexine-Pe (Apoptosis Detection Kit, BDBiosciences, San José, EU)
- CaCl₂ (25mM)

Ensuite les cellules sont lavées avec le tampon de lavage (10mM HEPES, 140mM NaCl ; 2,5mM CaCl₂) et fixées avec le tampon de lavage-0,75% formaldéhyde.

Les cellules marquées sont ensuite analysées par cytométrie en flux.

6. Analyse de la prolifération

L'analyse de la prolifération cellulaire s'effectue par marquage au CFSE (Cell Trace™ CFSE Cell Proliferation Kit, Invitrogen SARL, Cergy Pontoise, France). Le protocole est réalisé en suivant les instructions du fabricant. En bref, 4 millions de PBMC sont marquées avec 1 μ L CFSE (1 μ M) dans du PBS-0,1% BSA pendant 10 minutes à 37°C. Le marquage est ensuite stoppé en ajoutant 8ml de milieu de culture froid (4°C), les cellules sont ensuite lavées deux fois dans le milieu de culture (4°C), incubées 5 min sur la glace et lavées deux fois supplémentaires. Les cellules ainsi marquées sont mise en culture en présence des différentes interleukines comme décrit précédemment.

Après sept jours de culture 10^5 cellules /condition sont prélevées et marquées soit par :

Une combinaison d'anticorps anti-CD4-PeCy (Clone: SK3, BD Biosciences, San José, EU) et anti-CD8-APC (Clone: RPA-T8 BD Biosciences, San José, EU) afin d'évaluer l'effet des différentes cytokines sur les populations CD4 et CD8 totales

Soit par le cocktail d'anticorps anti-CD4-Pe (Clone: SK3, BD Biosciences, San José, EU) anti-CD45RA-PeCy (Clone: L48, BD Biosciences, San José, EU), anti-CD27APC (Clone : L128, BD Biosciences, San José, EU) pour évaluer les effets des cytokines sur les sous-populations des

cellules T CD4⁺.

Les cellules sont incubées en présence des anticorps pendant 20 minutes à température ambiante à l'abri de la lumière, elles sont ensuite lavées avec du PBS et fixées avec du PBS-0,75% avant d'être analysées par cytométrie en flux.

7. Marquage de la chaîne α du récepteur à L'IL-7 (CD127)

Les PBMC des patients sont décongelées et 10⁶ cellules sont incubées dans 50 μ L de PBS-0,1%BSA avec le cocktail d'anticorps suivant

-Anticorps anti-CD127-FITC (Clone HIL-7R-M21, BD Bioscience, San José, EU) ou Anticorps anti-IgG1-FITC de souris (clone MOPC-21, BDBioscience, San José, EU) comme témoin négatif.

- Anticorps anti-CD4-Pe (Clone: SK3, BDBioscience, San José, EU)

- Anticorps anti-CD45RA-PeCy (Clone: L48, BDBioscience, San José, EU)

- Anticorps anti-CD27APC (Clone: L128, BDBioscience, San José, EU)

Après 30 minutes d'incubation les cellules sont lavées avec du PBS et fixées avec du PBS-0,75%Formaldéhyde pour lecture au cytomètre.

8. Analyse en cytométrie en flux

L'analyse des cellules marquées par les différents fluorochromes est réalisée à l'aide d'un cytomètre FACScalibur (Becton Dickinson, Franklin Lakes, EU). L'acquisition des cellules se fait à l'aide du logiciel Cell Quest. L'analyse des lymphocytes CD8⁺ et CD4⁺ totaux est effectuée sur une acquisition de 20000 cellules. Pour l'analyse de la prolifération et l'expression CD127 des sous-populations CD4⁺, 100000 cellules sont acquises pour être analysées. Les données brutes de cytométrie sont ensuite analysées à l'aide du logiciel FlowJo.

Les résultats sont donnés en pourcentage de cellules marquées positives pour la mesure de l'apoptose et de l'expression du CD127. Pour l'analyse de la prolifération on utilise l'outil de modélisation du logiciel d'analyse, qui permet de calculer le pourcentage des cellules ayant proliféré.

9. Analyse Statistique.

Toutes les analyses statistiques sont effectuées à l'aide du logiciel Graphpad.

- Pour comparer la réponse au sein des différents groupes VIH-, CD4hi et CD4lo le test d'ANOVA à une voie est effectué.
- Pour comparer les effets des différentes cytokines au sein d'un même groupe on effectue un test ANOVA à mesures répétées suivi d'un post test pour comparer les effets des molécules deux à deux.
- Pour comparer les effets de l'IL-15 et du RLI le test apparié de Wilcoxon est utilisé.
- Le test de Spearman est utilisé pour le calcul des corrélations.

Une différence est considérée significative lorsque $p < 0,05$.

C. Résultats

1. Effet anti-apoptotique des cytokines

L'analyse de l'apoptose spontanée est effectuée par marquage à l'Annexine-V, qui se fixe aux phosphatidylsérines transloquées sur le feuillet externe de la membrane lorsque la cellule entre en apoptose. Le pourcentage de cellules Annexine V est mesuré pour chaque condition de culture. Les populations lymphocytaires TCD4⁺ et TCD8⁺ sont analysées séparément (figure 32)

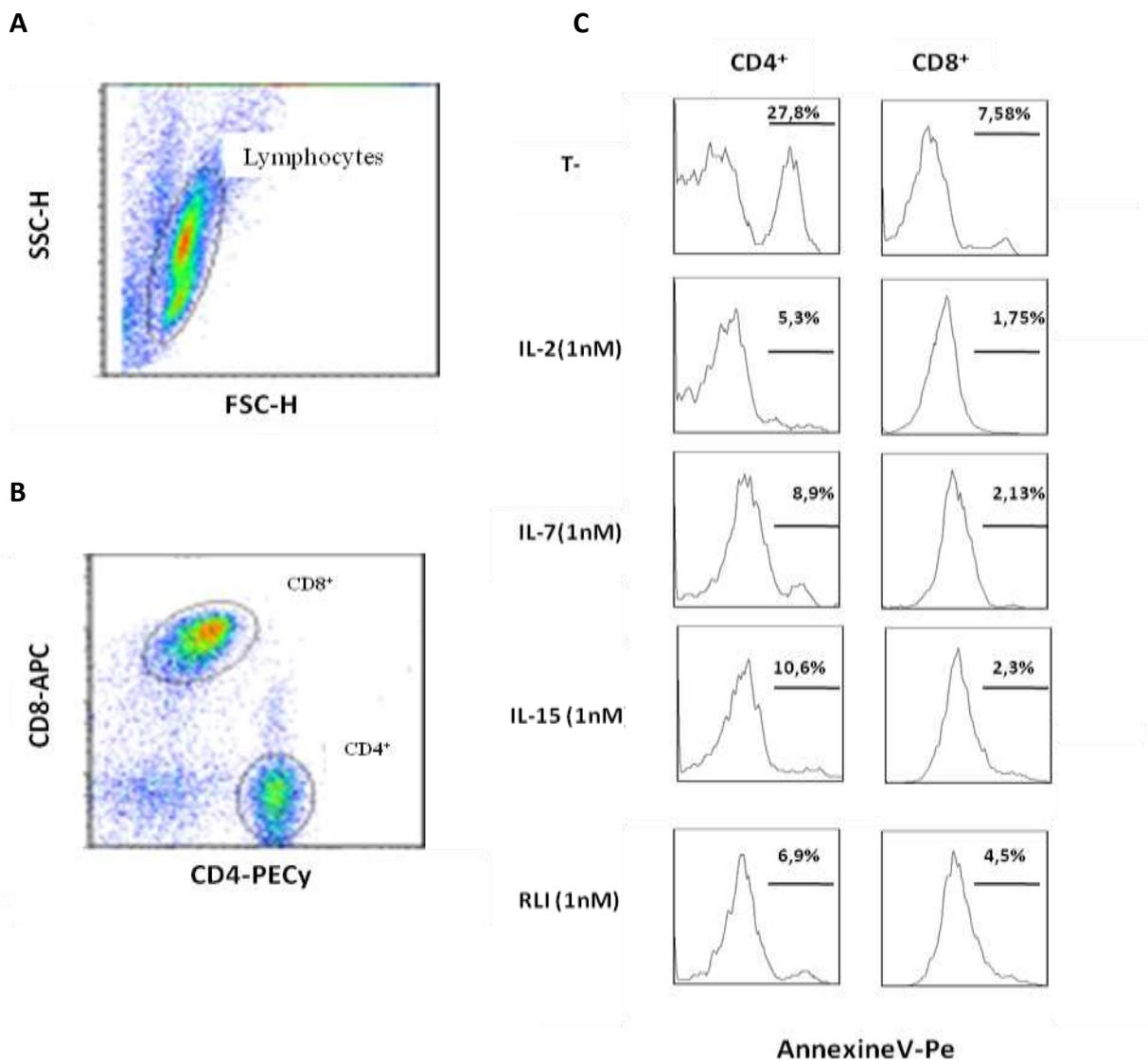


Figure 32: Mesure de l'apoptose spontanée par marquage à l'Annexine-V et analyse par cytométrie en flux

Exemple du patient CD4^{hi} 169.

A: La population de lymphocytes est identifiée selon leur morphologie, observée dans le cytogramme biparamétrique SSC (Side scatter) X FSC (forward scatter)

B: Cytogramme montrant le marquage de la population CD4⁺ (FL3) et CD8⁺ (FL4) au sein de la population lymphocytaire

C: Marquage Annexine-V-Pe (FL2) dans les fenêtres CD4 ou CD8 en fonction des différentes conditions de culture

- Les effets anti-apoptotiques des cytokines sur les cellules CD8⁺** ont été évalués chez 13 patients VIH⁺ et 7 donneurs sains (figure 33). L'apoptose spontanée des cellules CD8⁺ sans stimulation par les cytokines (témoin négatif) est significativement plus élevée chez les patients VIH⁺ que chez les donneurs sains (Médiane de 18% de cellules Annexine-V⁺ pour les patients VIH⁺ contre 2,7% pour le donneurs sains, $p < 0,001$). Dans le groupe de patients VIH⁺, les molécules IL-2, IL-7, IL-15 et RLI testées montrent toutes une activité anti-apoptotique sur les cellules CD8⁺ par rapport au témoin négatif (test ANOVA à mesures répétées suivi d'un test post-hoc). Même si les niveaux d'apoptose diminuent quand les PBMC des patients VIH⁺ sont stimulés par les quatre cytokines, il apparaît que l'apoptose reste significativement plus élevée chez les sujets VIH⁺ même après stimulation par l'IL-7, l'IL-15 ou le RLI ($p < 0,05$). Lorsque les cellules sont stimulées par l'IL-2 les taux d'apoptose entre les VIH⁺ et les donneurs sains sont comparables ($p = 0,13$).

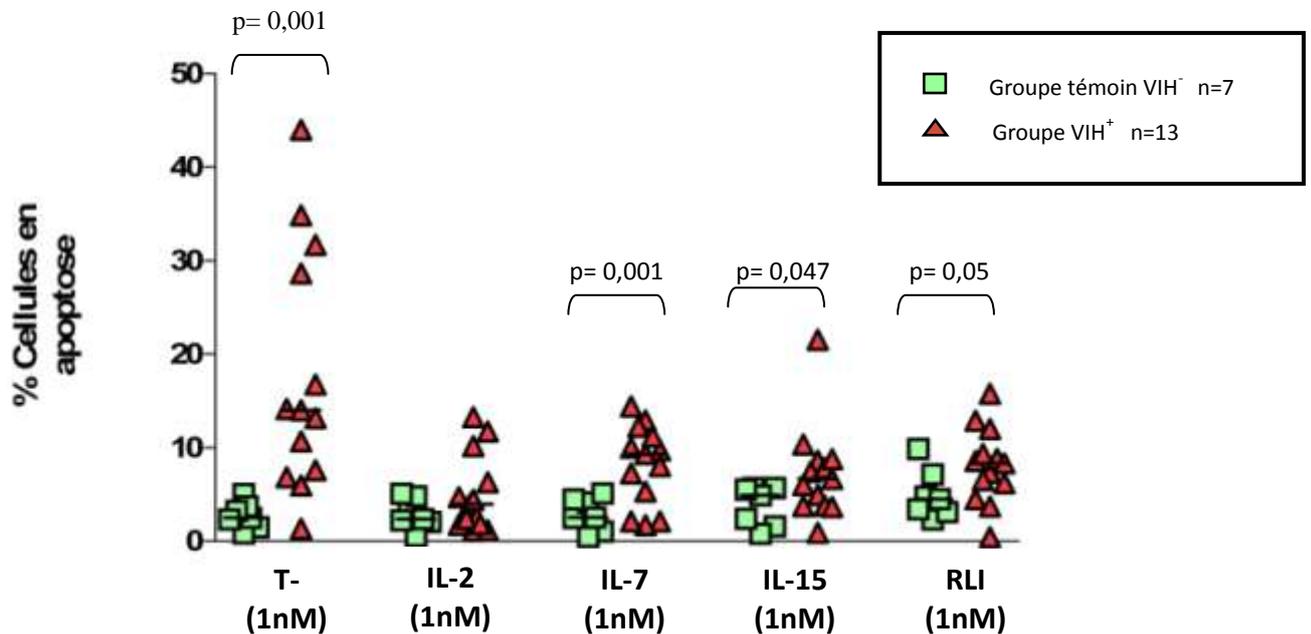


Figure 33: Effet anti-apoptotique d'IL-2, IL-7, IL-15 et RLI sur les cellules T CD8⁺

Seules les différences significatives sont représentées

Le pourcentage de TCD8⁺ en apoptose (Annexine V⁺) est comparé entre 13 patients VIH⁺ (▲) et 7 patients témoins séronégatifs pour le VIH (■). Le niveau d'apoptose baisse en réponse aux différentes cytokines mais reste significativement plus élevé dans le groupe VIH⁺ en présence d'IL-7, d'IL-15 ou de RLI ($p < 0,05$)

- **Concernant la population des lymphocytes T CD4⁺** l'apoptose spontanée est plus élevée chez les patients VIH⁺ (pourcentage médian : 10,6%) que pour le groupe contrôle (4,5%). De plus, il en ressort que les niveaux apoptotiques des patients VIH⁺ redeviennent identiques à ceux du groupe contrôle lorsque les PBMC sont stimulées par l'une des quatre molécules testées. L'IL-2, l'IL-7, l'IL-15 et le RLI montrent toutes un effet anti-apoptotique en comparaison avec les PBMC non stimulées, mais aucune différence entre les quatre molécules n'est observée (figure 34)

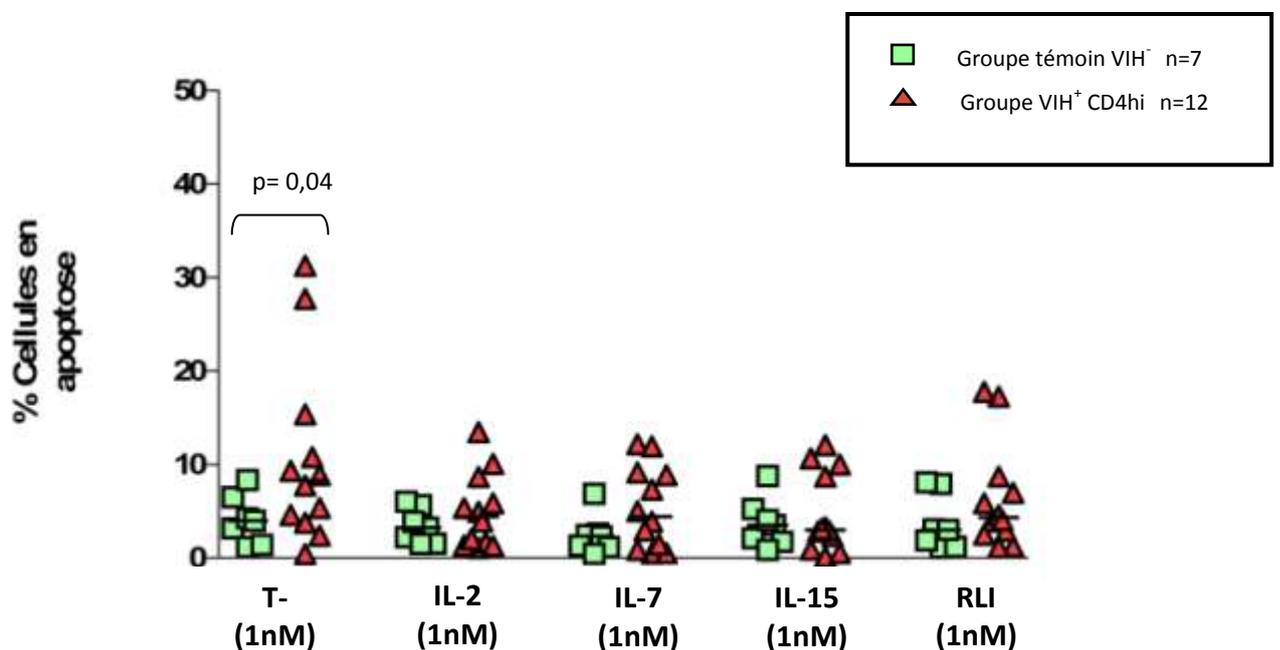


Figure 34: Effet anti-apoptotique d'IL-2, IL-7, IL-15 et RLI sur les cellules T CD4⁺

Seules les différences significatives sont représentées

Le pourcentage de TCD4⁺ en apoptose (Annexine V⁺) est comparé entre 12 patients VIH⁺ (▲) et 7 patients témoins séronégatifs pour le VIH (■). Le niveau d'apoptose baisse en réponse aux différentes cytokines

Les CD4⁺ et CD8⁺ du sang périphérique des patients VIH⁺ ont donc un niveau d'apoptose plus élevé que les donneurs sains. Ceci est en cohérence avec plusieurs données de la littérature montrant des taux élevés d'apoptose chez les patients infectés qui contribue à la déplétion immunologique observée chez les patients (Mitra et al., 1996) (Xu et al., 1997) (Lum et al., 2005) (Poonia et al., 2009). Toutefois les lymphocytes CD4⁺ et CD8⁺ récupèrent des niveaux d'apoptose spontanée bas après la stimulation par les molécules testées (IL-2, IL-7, IL-15 et RLI), aucune différence significative dans la capacité anti-apoptotique des différentes cytokines est mise en évidence lors de notre études. Ces observations sont cohérentes avec différentes études montrant que les cytokines de la famille de la chaîne γ commune sont des molécules anti-apoptotiques (Boudet et al., 1996) (Naora et Gougeon, 1999) (Mueller et al., 2003) (Vassena et al., 2007).

Cependant, il a été montré que l'IL-7, l'IL-15 et l'IL-2 augmentent l'expression de Fas par les lymphocytes T (Fluur et al., 2007) et la susceptibilité des LT à l'apoptose induit par le VIH (Lelièvre et al., 2005). Dans notre étude le compartiment T CD8⁺ des patients VIH⁺ (après stimulation par IL-7, IL-15 ou RLI) montre des taux d'apoptose diminués mais qui restent élevés par rapport à ceux du groupe témoin. Cette observation peut être expliquée par une sensibilité accrue à l'apoptose provoquée par les cytokines chez les patients VIH⁺

2. Effet prolifératif des cytokines

Pour évaluer le pourcentage de cellules ayant proliféré, nous avons utilisé un marquage CFSE (Carboxyl fluorescein diacetate succinidyl ester). Le CFSE est une molécule qui diffuse librement dans la cellule, où les estérases cellulaires coupent le groupe acétate en rendant la molécule chimiquement réactive. La partie ester de la molécule se couple alors avec les fonctions amines libres formant des liaisons covalentes qui la stabilisent à l'intérieur de la cellule. A chaque division cellulaire, la fluorescence est partagée de manière égale entre les cellules filles ce qui permet de suivre le nombre de divisions et la quantité des cellules ayant proliféré.

Nous avons analysé le pourcentage de prolifération des lymphocytes TCD4⁺ et TCD8⁺ après sept jours en présence des différentes cytokines dans les conditions détaillées précédemment (figure 35)

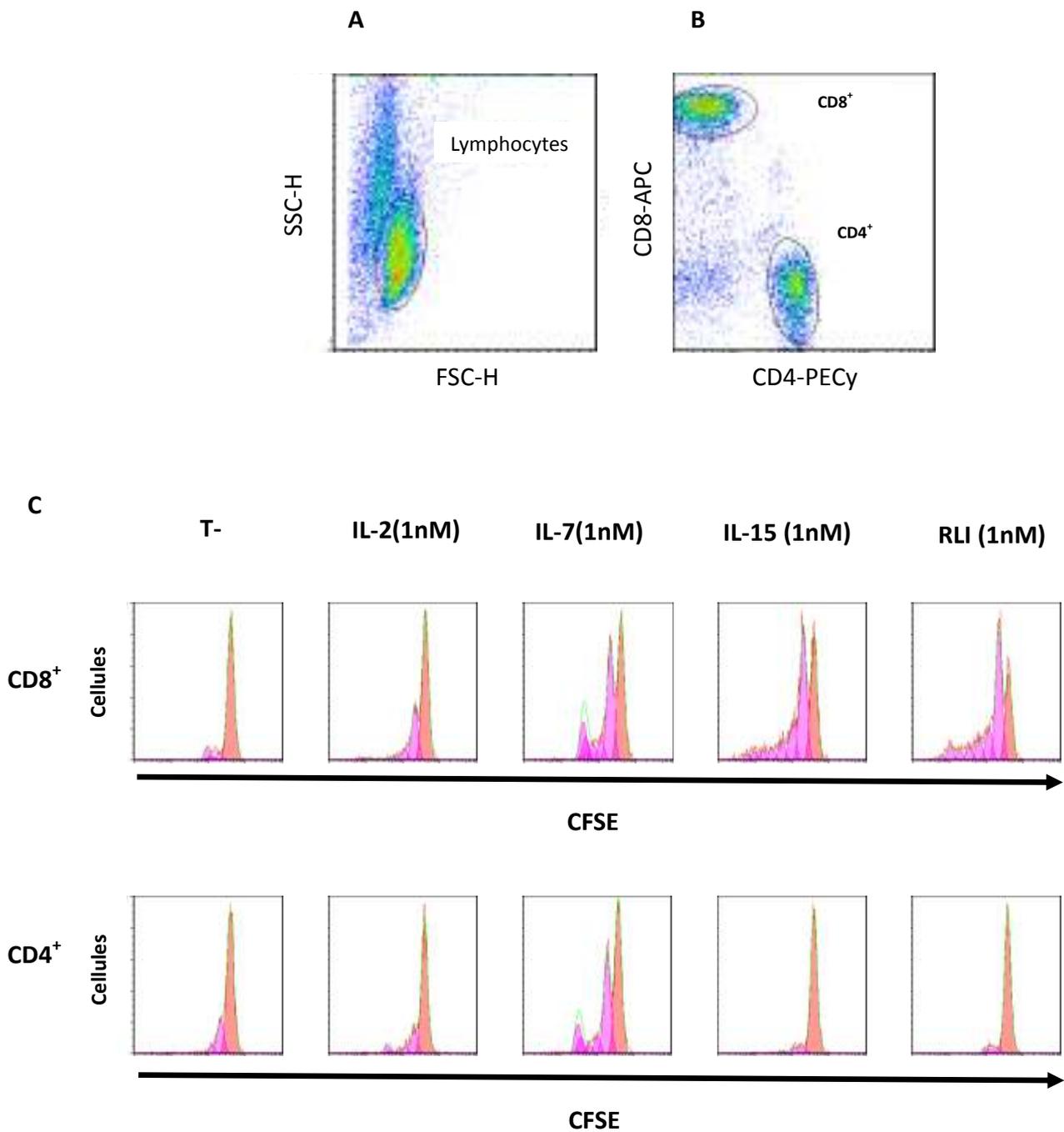


Figure 35: Mesure de la prolifération cellulaire par marquage par du CFSE et analyse par cytométrie en Flux

A : Cytogramme représentant la fenêtre de lymphocytes identifiés selon leur morphologie

B : Cytogramme montrant le marquage de la population CD4⁺ (FL2) et CD8⁺ (FL4) au sein de la population lymphocytaire

C : Marquage CFSE (FL1) dans les fenêtres CD4 ou CD8 en fonction des différentes molécules utilisées

- **L'analyse de la prolifération des cellules CD8⁺** est représentée sur la figure 36. Pour les trois groupes étudiés les résultats sont analogues et montrent que l'IL-7, l'IL-15 et le RLI stimulent efficacement la prolifération des lymphocytes CD8⁺ (test ANOVA à mesures répétées suivi d'un post test). Toutefois les molécules les plus efficaces sont l'IL-15 et le RLI. Cependant, la prolifération des lymphocytes CD8⁺ des patients CD4lo en réponse à l'IL-15 ou le RLI semble plus faible que celle observée chez les patients CD4hi ou chez les donneurs VIH⁻. Cette différence est significative en effectuant une comparaison de deux groupes (CD4hi vs CD4lo et CD4lo vs VIH⁻) mais non significative en comparant les trois groupes par ANOVA à une voie.

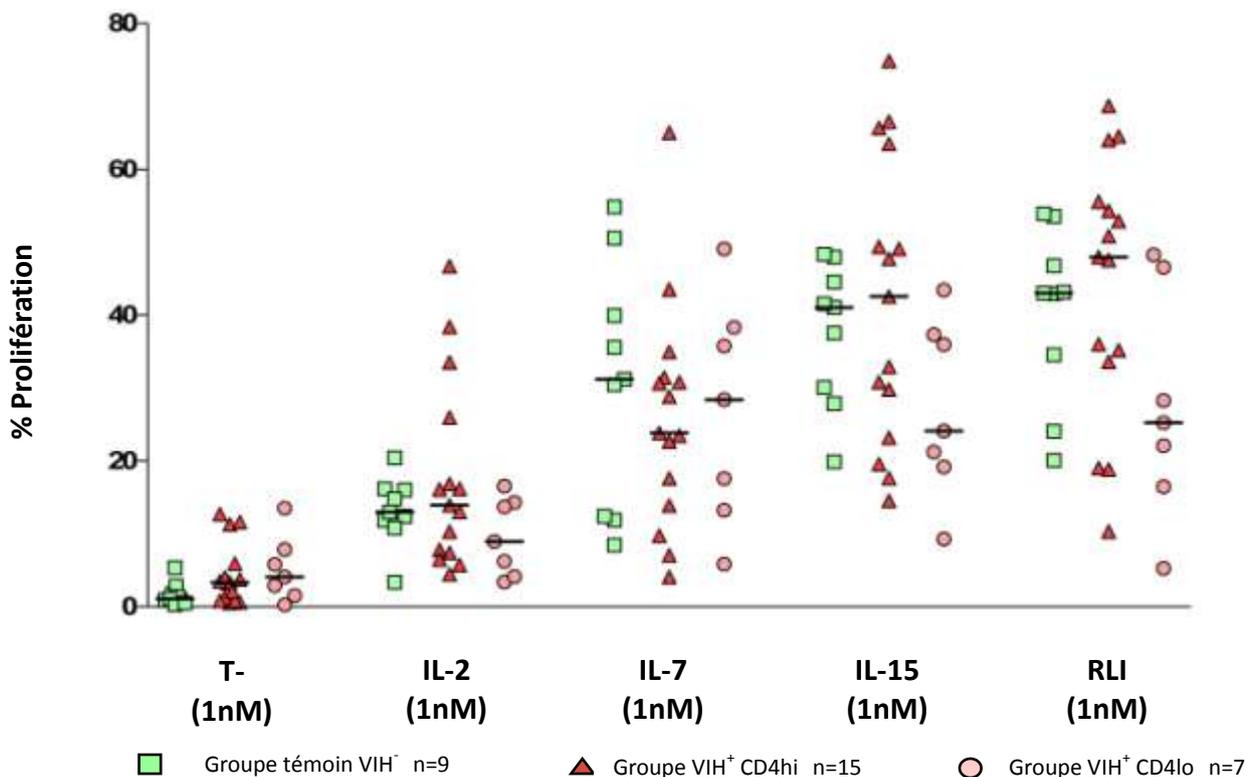


Figure 36: Effet prolifératif d'IL-2, IL-7, IL-15 et RLI sur les cellules T CD8⁺

Le pourcentage de prolifération a été calculé après marquage au CFSE. La valeur médiane de prolifération est représentée par un trait horizontal.

- **En ce qui concerne les lymphocytes CD4⁺**, l'analyse de la prolifération est présentée dans la figure 37. La capacité proliférative observée en réponse aux différentes cytokines n'est pas modifiée par l'infection ni par le nombre de CD4 présents dans le sang, étant donné que les groupes CD4hi, CD4lo et VIH⁻ répondent de manière comparable aux quatre molécules testées (ANOVA). Par ailleurs nous constatons que sur la population globale des lymphocytes CD4, ni l'IL-2 (Médiane : 6,1% pour le groupe témoin, 7% pour le groupe CD4hi et 6,6% pour le groupe CD4lo) ni l'IL-15 (Médiane : 10,1% pour le groupe témoin, 9,8% pour le groupe CD4hi et 8,5% pour le groupe CD4lo) ni son agoniste RLI (Médiane : 10,4% pour le groupe témoin, 7,5% pour le groupe CD4hi et 11,5% pour le groupe CD4lo) ne montrent d'effets prolifératifs conséquents, alors que l'IL-7 est la seule cytokine à induire une réponse proliférative (Médiane : 16,1% pour le groupe témoin, 22,10% pour le groupe CD4hi et 24,3% pour le groupe CD4lo) ($p < 0,05$).

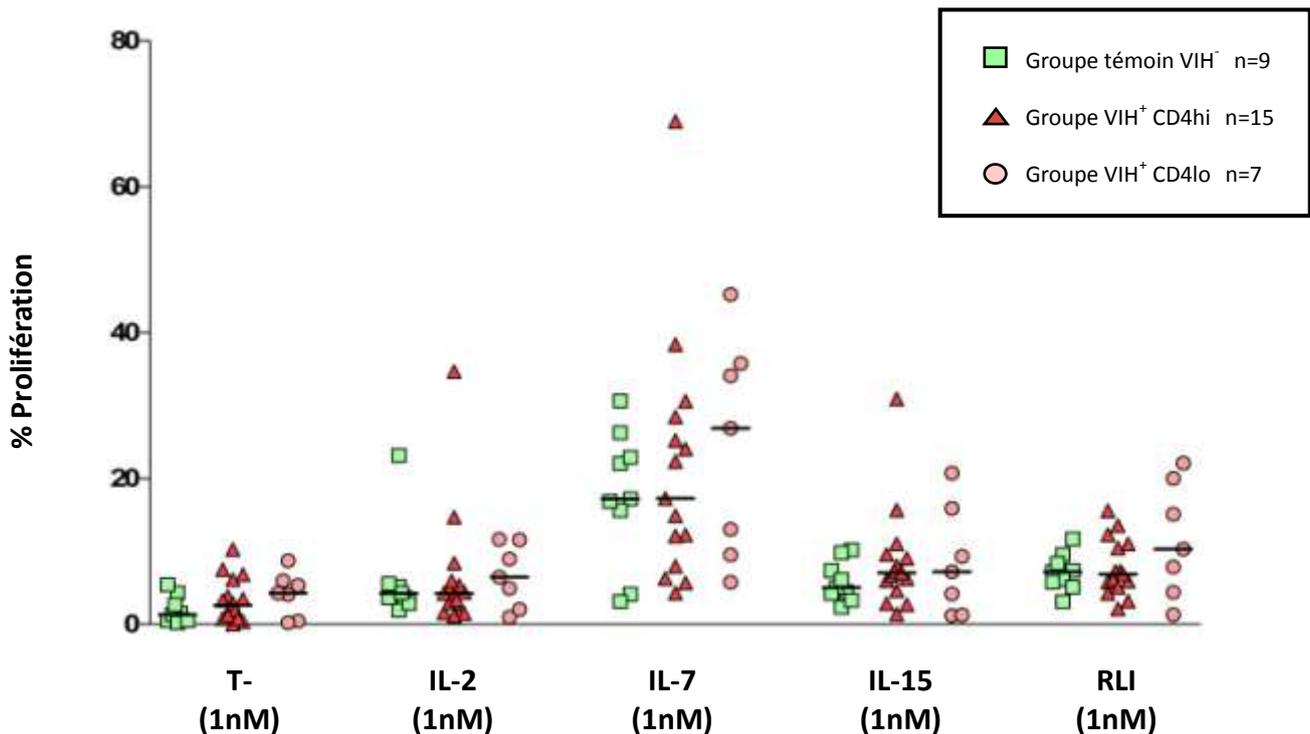


Figure 37: Effet prolifératif d'IL-2, IL-7, IL-15 et RLI sur les cellules T CD4⁺

Le pourcentage de prolifération a été calculé après marquage au CFSE. La valeur médiane de prolifération est représentée par un trait horizontal pour chaque condition de culture.

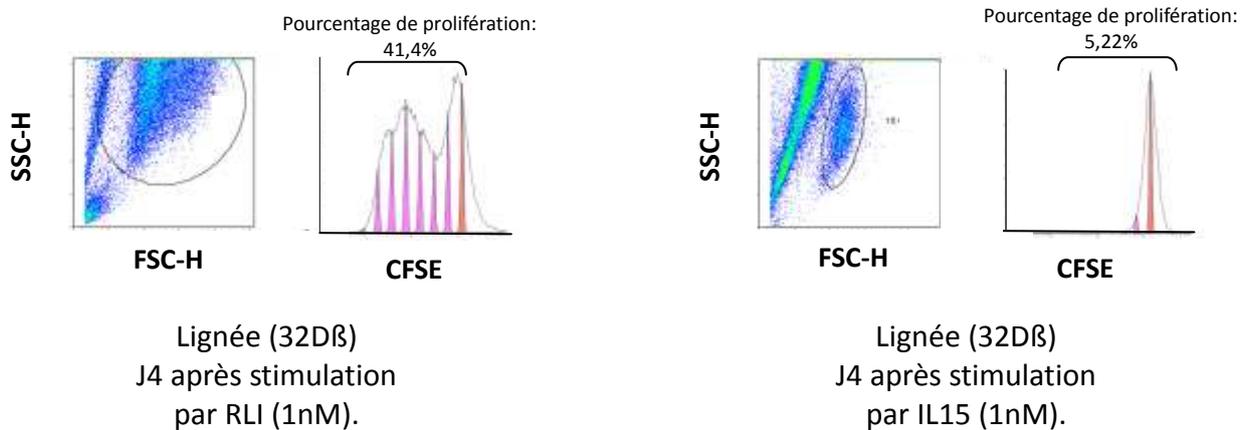
Les patients du groupe CD4_{lo} ne montrent pas de diminution significative de la réponse proliférative aux cytokines testées par rapport aux patients CD4_{hi}, ni par rapport au groupe témoin. Malgré la progression rapide de la maladie ou le stade avancée de la maladie les lymphocytes CD4⁺ et CD8⁺ gardent leur capacité à proliférer en réponse aux stimulations par les cytokines. Ceci est un bon argument en faveur de la thérapie adjuvante par les cytokines de la chaîne γ commune dans la restauration du compartiment CD4 chez les patients ayant un taux de CD4 très faible ou chez qui la perte est rapide.

3. Comparaison de l'efficacité IL-15/RLI

Un des objectifs majeurs de notre étude a été de comparer les effets de l'IL-15 et le RLI dans notre système. Les résultats attendus étaient que l'agoniste de l'IL-15, le RLI, montre une efficacité supérieure que celle de l'IL-15 native. En effet, l'équipe du Dr. Y Jacques (Inserm 892, Nantes) a montré que des lignées cellulaires exprimant exclusivement les chaînes $\beta\gamma$ du récepteur à l'IL-15, prolifèrent uniquement en présence de RLI et non pas avec l'IL-15

Dans le cadre de notre protocole nous avons confirmé ces observations par marquage CFSE comme le montre la figure 38A. La prolifération induite par le RLI sur une lignée 32D β exprimant uniquement les chaînes $\beta\gamma$ d'IL-2/IL-15R est au moins dix fois plus importante que celle induite par l'IL-15 native (figure 38B)

A



B

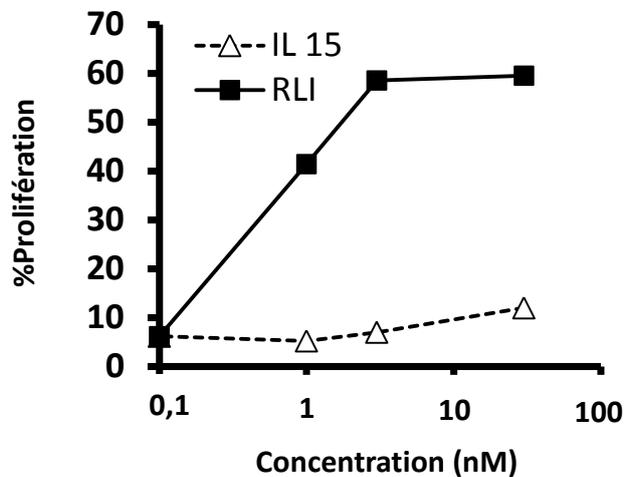


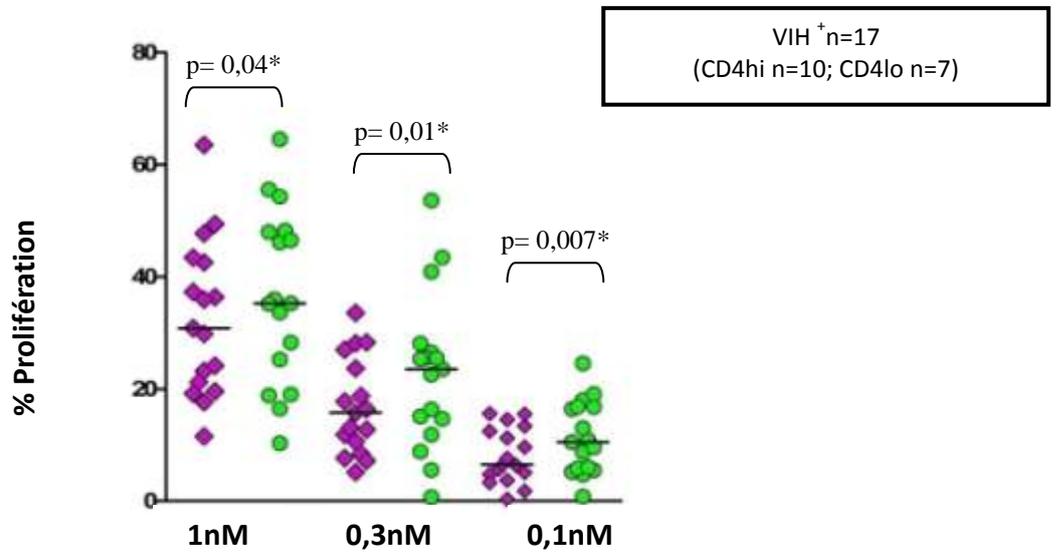
Figure 38: Réponse proliférative de la lignée 32D β au RLI et à l'IL-15

La lignée 32D β est une lignée cellulaire exprimant uniquement les chaînes $\beta\gamma$ du récepteur à l'IL-15. La réponse proliférative est évaluée après marquage par le CFSE et quatre jours de culture cellulaire sous stimulation d'IL-15 ou RLI.

A : Analyse des effets prolifératifs de l'IL-15 et le RLI sur la lignée 32D β par cytométrie en flux. Sur le cytogramme biparamétrique FSC-H x SSC-H on détermine la région des cellules vivantes en fonction de leur morphologie. L'histogramme représente le marquage CFSE des cellules 32D β , la valeur indiquée est le pourcentage des cellules ayant proliféré après 4 jours de culture avec RLI (à gauche) et IL-15 (à droite)

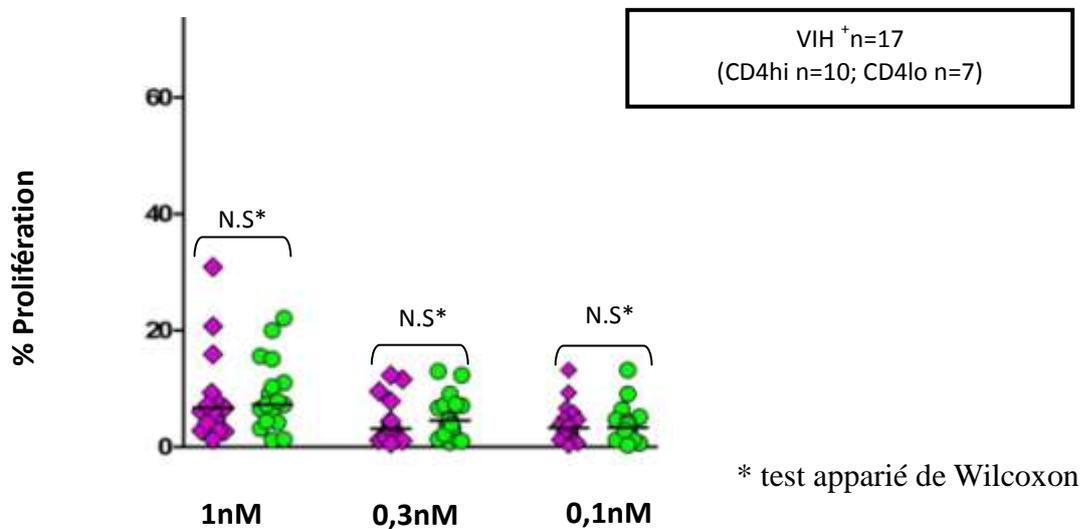
B : Réponse proliférative de cellules 32D β à la stimulation par différentes concentrations d'IL-15 (Δ) ou de RLI (\blacksquare)

Par contre, l'analyse des patients VIH⁺ ne confirme pas les résultats observés avec la lignée cellulaire. Même si une meilleure efficacité proliférative du RLI (EC₅₀: 0,2nM pour le RLI contre 0,35nM pour l'IL-15) est mise en évidence sur les cellules CD8⁺ (figure 39), elle est beaucoup moins spectaculaire que celle observée pour la lignée 32Dβ (EC₅₀: 0,4nM pour le RLI contre plus de 30nM pour l'IL-15). Concernant la population des lymphocytes CD4⁺, l'effet prolifératif reste faible pour l'IL-15 et pour le RLI et dans ce cas aucune différence n'est observée en termes d'efficacité des deux molécules (figure 40).



* test apparié de Wilcoxon

Figure 39 : Réponse proliférative des lymphocytes CD8⁺ en fonction de la dose du RLI (●) ou d'IL-15 (◇).



* test apparié de Wilcoxon

Figure 40 : Réponse proliférative des lymphocytes CD4⁺ en fonction de la dose du RLI (●) ou de l'IL-15 (◇).

Par la suite nous avons voulu comprendre pourquoi le RLI ne s'est pas montré plus efficace que l'IL-15 dans le cadre de notre protocole.

La différence majeure entre les PBMC des sujets étudiés et la lignée 32D β , est la présence de monocytes et de cellules dendritiques pouvant exprimer l'IL15R α parmi les PBMC. Il est donc possible que la présence de l'IL15R α permette une "présentation" efficace de l'IL15. Le fait que la transprésentation de l'IL-15 native s'effectue de manière correcte peut expliquer que le RLI ne montre pas une efficacité supérieure dans notre protocole *in vitro*.

Nous avons donc comparé les effets de l'IL15 et du RLI sur des lymphocytes purifiés à partir des PBMC totales. Une purification des lymphocytes T par billes magnétiques a été réalisée sur 7 témoins VIH négatifs. L'efficacité de la purification a été testée en marquant les PBMC avant et après le tri magnétique avec un anticorps anti-CD3 (figure 41).

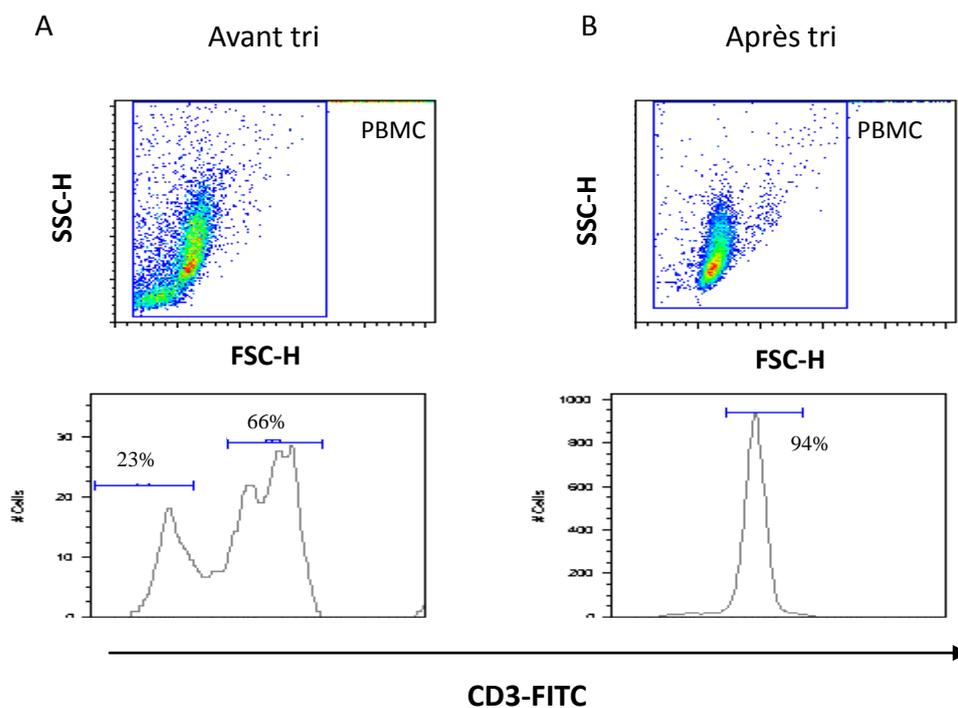


Figure 41: Marquage CD3 des PBMC avant et après tri magnétique des lymphocytes T

A : Avant tri : 66% des PBMC étaient CD3⁺

B : Après tri : 94% des cellules étaient CD3⁺

Les cellules PBMC avant et après purification sont marquées par CFSE et mises en culture avec les différentes cytokines.

Malheureusement, nos résultats ne sont pas exploitables car les lymphocytes T purifiés ont été incapables de proliférer. Un exemple des résultats obtenus est représenté sur la figure 42. Des résultats similaires ont été obtenus pour les six essais supplémentaires effectués sur les lymphocytes T purifiés. De ce fait, il n'a pas été possible de tester notre hypothèse sur le rôle des monocytes dans la transprésentation de l'IL-15.

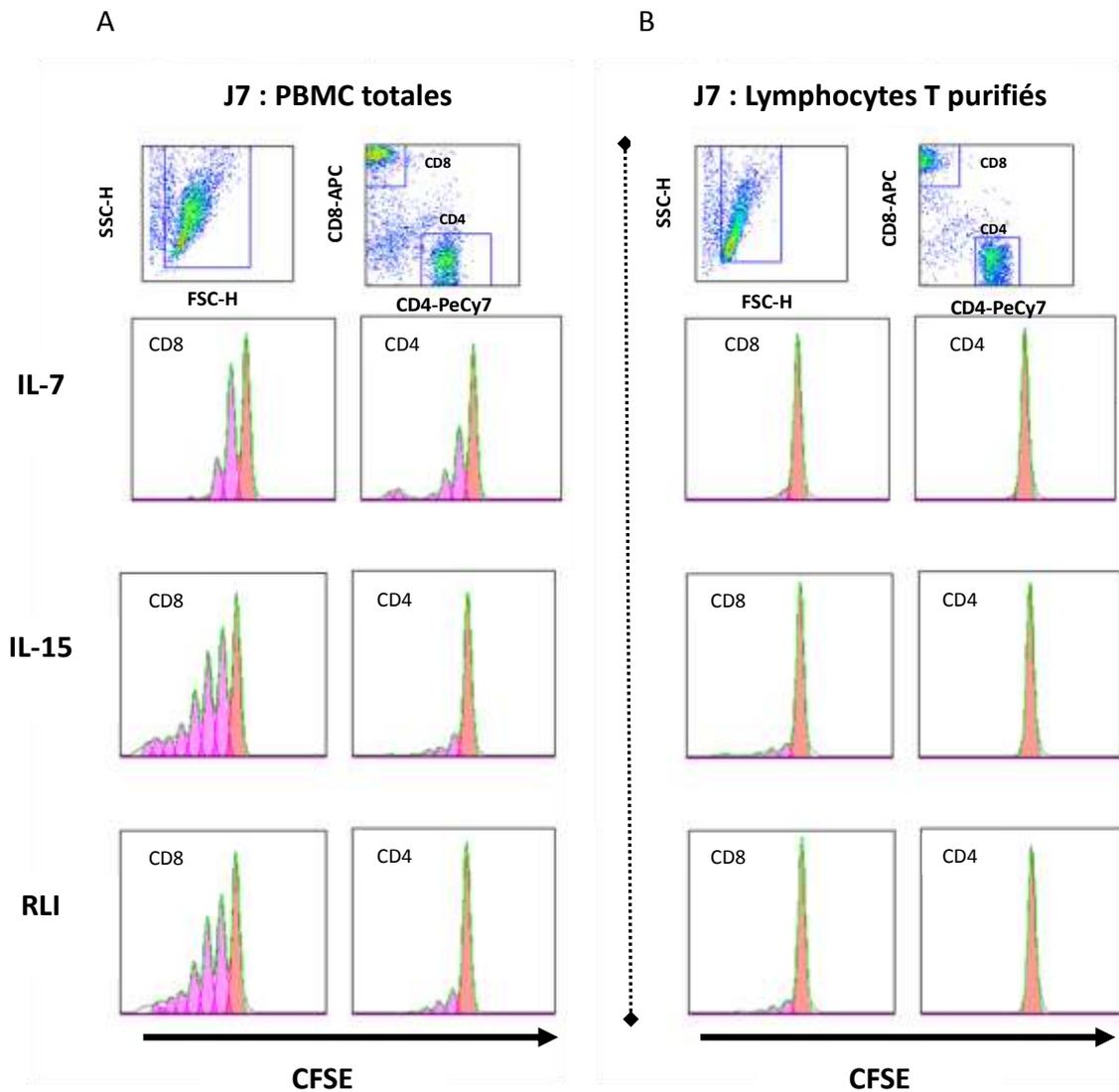


Figure 42 : Réponse proliférative à IL-7, IL-15 et RLI des cellules CD8⁺ et CD4⁺

La réponse proliférative (marquage au CFSE) a été mesurée pour les PBMC non triées (A) et les T purifiés (B), séparément pour les lymphocytes T CD4⁺ et T CD8⁺.

Aucune réponse proliférative n'a été obtenue avec les lymphocytes T purifiés. (B)

4. Prolifération au sein des sous-populations T CD4⁺

Certains travaux récents sur des patients VIH⁺ ont démontré un déficit des réponses fonctionnelles à l'IL-7 plus important chez les LT CD4⁺ mémoires que chez les LT CD4⁺ naïfs (Bazdar et al., 2009) (Juffroy et al., 2010). De plus, comme la majorité des lymphocytes T CD4⁺ dans les PBMC sont naïfs, il est possible qu'un déficit fonctionnel restreint à une des sous-populations mémoires soit caché par la sous-population majoritaire. Pour appréhender plus en détail les effets des molécules utilisées sur les différentes sous-populations T CD4⁺ chez les sujets étudiés, nous avons analysé la réponse proliférative de chaque sous-population après stimulation par les cytokines. Au total les PBMC de 9 donneurs sains et 8 patients VIH⁺ appartenant au groupe CD4hi ont été testées. La prolifération des sous-populations lymphocytaires TCD4⁺ : Naïves (CD45RA⁺, CD27⁺), mémoire effectrice (CD45RA⁻, CD27⁻) et mémoire centrale (CD45RA⁻, CD27⁺) a été analysée (figure 43).

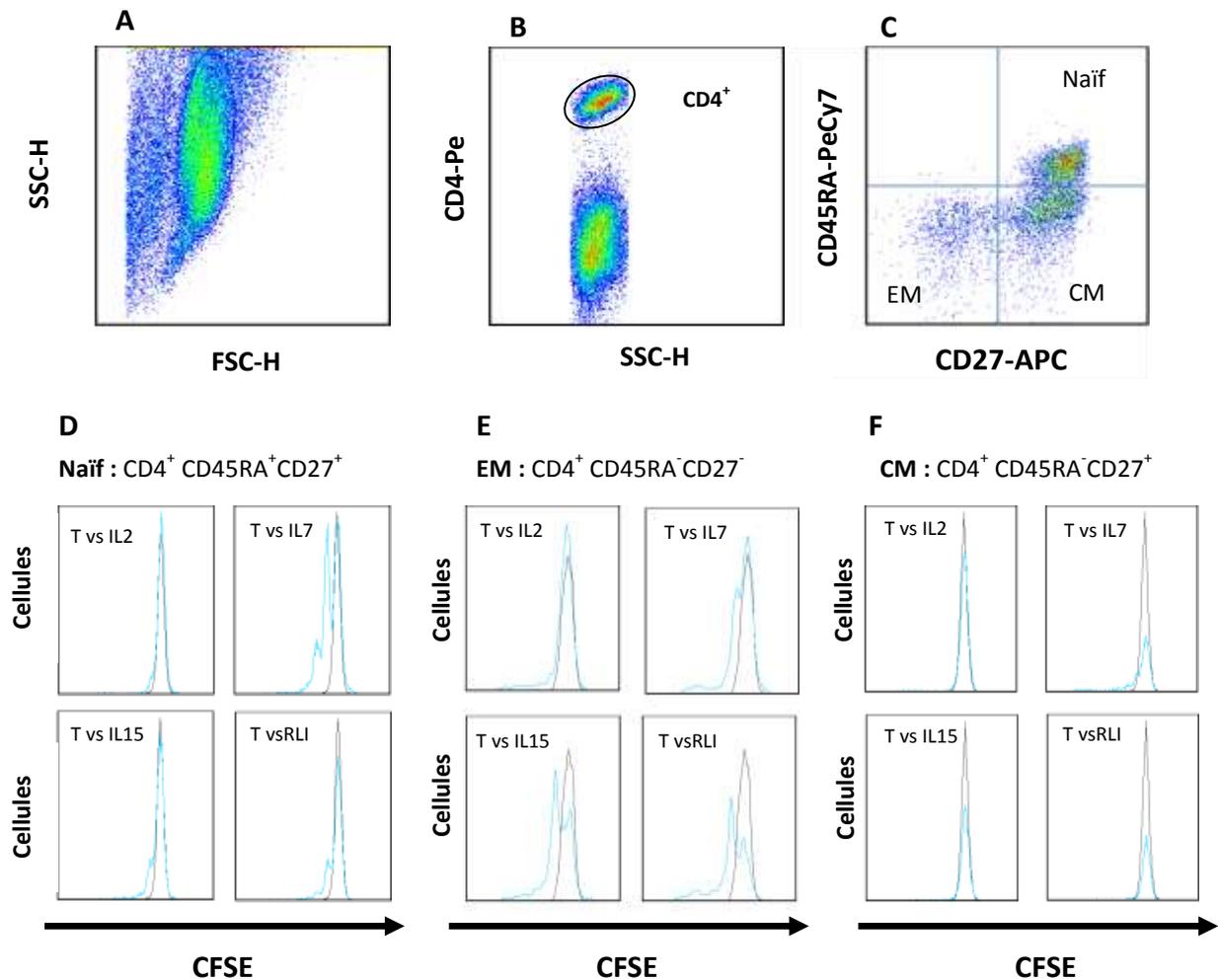


Figure 43: Analyse de la prolifération cellulaire induite par l'IL-2, IL-7, IL-15 et RLI au sein des sous-populations CD4⁺ (exemple patient 374)

A : Identification de la population lymphocytaire en fonction de leur morphologie (SSC-H X FSC-H)

B : Population de Lymphocytes marquées CD4-Pe⁺

C : Identification des sous-populations au sein de la population des Cellules T CD4⁺ : Naïves (CD45RA⁺, CD27⁺) ; mémoire effectrice (CD45RA⁻, CD27⁻) ; mémoire centrale (CD45RA⁻, CD27⁺)

(D-F) : Histogrammes représentant le marquage CFSE après 7 jours de stimulation par IL-2, IL-7, IL-15 et RLI (en bleu clair) en comparaison avec des PMBC non stimulées (Noir) au sein des sous-populations :

D : Naïves

E : mémoire effectrice (EM)

F : mémoire centrale (CM)

Le pourcentage de prolifération des lymphocytes CD4⁺ Naïfs (CD45RA⁺;CD27⁺) est comparé entre les deux groupes: témoins VIH⁻ et VIH⁺ CD4hi (figure 44).

La comparaison des deux groupes dans chaque condition de culture ne montre pas de différences significatives. Sous les différentes conditions testées, les LT CD4⁺ naïfs des patients VIH⁺ ne présentent pas de défaut de réponse fonctionnelle.

Pour comparer les effets prolifératifs des cytokines entre elles nous effectuons le test ANOVA à mesure répétées, ensuite un post-test qui permet de comparer les cytokines deux à deux est effectué. Dans le groupe des patients VIH⁺, l'IL-7 est la seule cytokine à entraîner une prolifération significativement plus élevée que celle du témoin négatif (17,4% vs 0%) (Tableau XII).

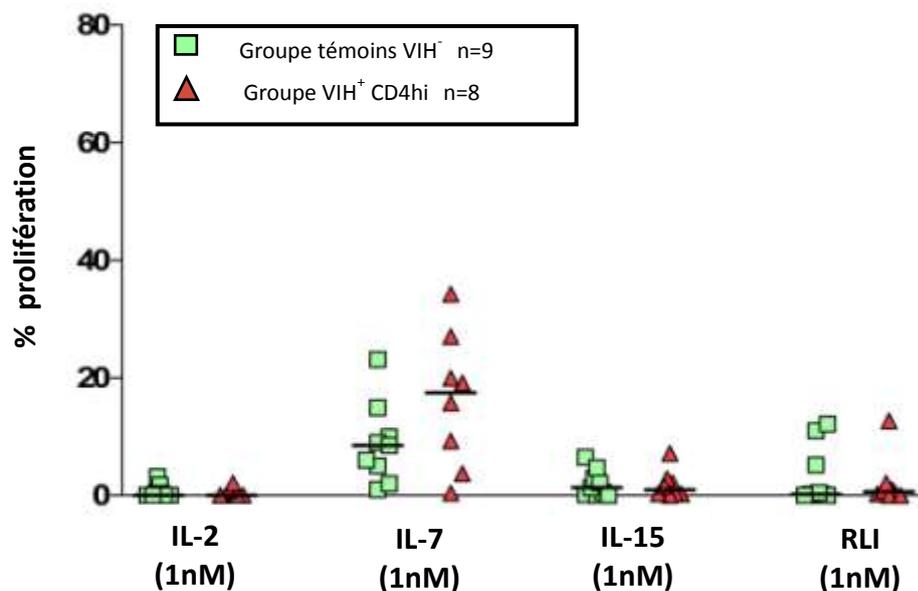


Figure 44: Effet prolifératif de l'IL-2, IL-7, IL-15 et RLI sur les cellules T CD4⁺ Naïfs (CD45RA⁺; CD27⁺)

Le pourcentage de prolifération a été calculé après marquage au CFSE. Les valeurs représentées sur la figure représentent la valeur mesurée moins la valeur du témoin négatif. La valeur médiane de prolifération est représentée par un trait noir horizontal.

Tableau XII: Résultats du post test comparant deux à deux les effets des cytokines sur les Lymphocytes T CD4⁺ naïfs (groupe de patients VIH⁺)

Suite au test ANOVA à mesure répétées indiquant si les effets des cytokines sont significativement différents, un post-test permet la comparaison deux à deux de ces effets.

Comparaisons	p<0,05 ?	I.C (95%)
T vs IL-2	ns	-7.748 à 6.585
T vs IL-7	*	-23.40 à -9.068
T vs IL-15	ns	-9.040 à 5.293
T vs RLI	ns	-9.159 à 5.174
IL-2 vs IL-7	*	-22.82 à -8.487
IL-2 vs IL-15	ns	-8.459 à 5.874
IL-2 vs RLI	ns	-8.578 à 5.755
IL-7 vs IL-15	*	7.195 à 21.53
IL-7 vs RLI	*	7.076 à 21.41
IL-15 vs RLI	ns	-7.285 à 7.048

* p< 0,05 ns : Non significatif

- **L'analyse de la prolifération des cellules T CD4⁺ mémoire effectrice**, montre qu'il n'existe pas de différence significative entre les réponses du groupe VIH⁺ et VIH⁻ (figure 45).

Néanmoins, les lymphocytes CD4⁺ EM des patients VIH⁺ en comparaison avec ceux du groupe témoin semblent répondre de manière moins efficace à la stimulation de l'IL-7 avec une p-value proche de la significativité ($p=0,07$). Malgré la présence de deux donneurs n'ayant pas proliféré, 19,7% des T CD4⁺ EM (range: 4-45%) prolifèrent en réponse à l'IL-7 chez les donneurs VIH⁻. Au contraire, pour le groupe de patients VIH⁺ la médiane de T CD4⁺ EM ayant proliféré est de 5,4% : sept patients présentent une réponse homogène à l'IL-7 avec des pourcentages compris entre 0,1% et 16,5%. Une seule réponse très forte (67%) est mesurée chez un des patients VIH⁺.

La comparaison des effets obtenus avec les différentes cytokines sur les patients VIH⁺ montre que l'IL-15 (Médiane: 29,7% Range: 1 à 64,7%) est la cytokine qui induit le plus de prolifération dans ce compartiment. Même si le RLI (Médiane: 19% Range: 3 à 40,45%) montre des effets similaires à ceux de l'IL-15, la médiane est légèrement plus basse et son efficacité n'est pas mise en évidence par le post test (tableau XIII)

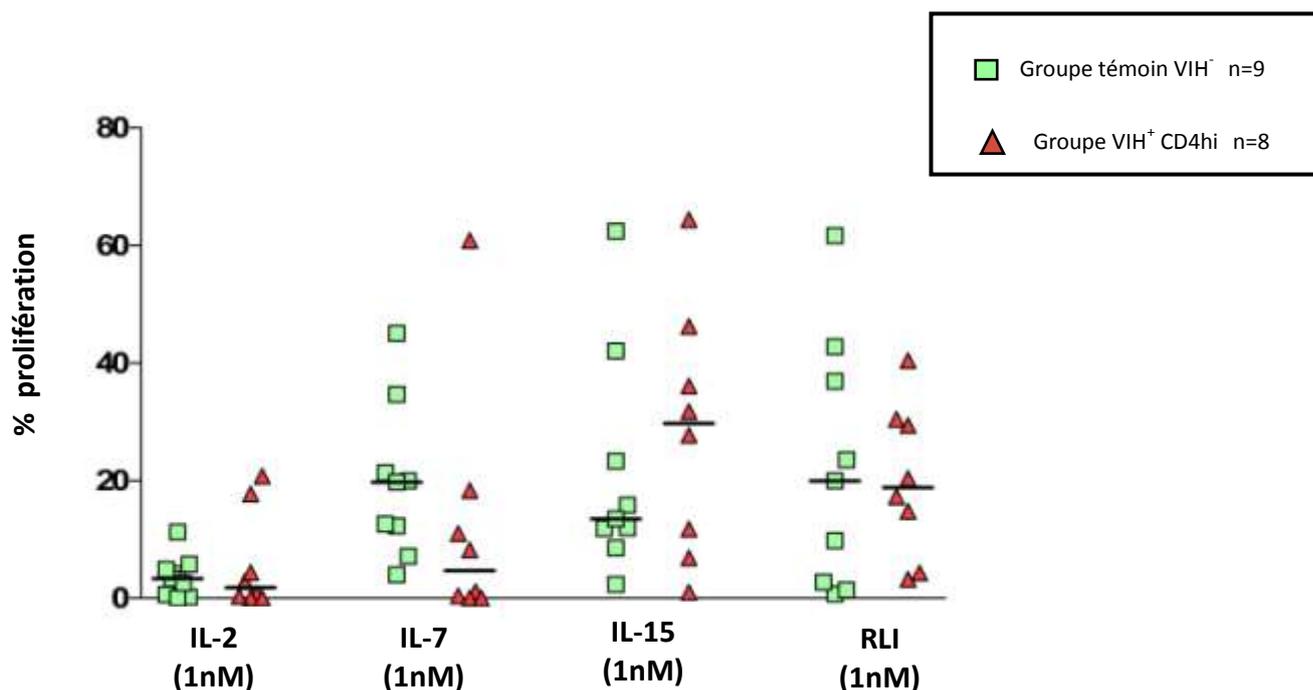


Figure 45: Effet prolifératif de l'IL-2, IL-7, IL-15 et RLI sur la sous-population T CD4⁺ mémoire effectrice (CD45RA⁻ ; CD27⁻)

Le pourcentage de prolifération a été calculé après marquage au CFSE. Les valeurs représentées sur la figure représentent la valeur mesurée moins la valeur du témoin négatif. La valeur médiane de prolifération est représentée par un trait noir horizontal.

Tableau XIII: Résultats du post test comparant deux à deux les effets des molécules sur les lymphocytes T CD4⁺_{EM} (groupe de patients VIH⁺)

Suite au test ANOVA à mesure répétées qui indique si les effets des cytokines sont significativement différents, un post-test permet la comparaison deux à deux de ces effets.

Comparaisons	P<0,05?	I.C (95%)
T vs IL-2	ns	-25.75 à 17.21
T vs IL-7	ns	-31.56 à 11.40
T vs IL-15	*	-48.90 à -5.934
T vs RLI	ns	-41.20 à 1.765
IL-2 vs IL-7	ns	-27.29 à 15.67
IL-2 vs IL-15	*	-44.63 à -1.667
IL-2 vs RLI	ns	-36.93 à 6.032
IL-7 vs IL-15	ns	-38.82 à 4.142
IL-7 vs RLI	ns	-31.12 à 11.84
IL-15 vs RLI	ns	-13.78 à 29.18

*p<0,05 ns : Non significatif

- En ce qui concerne la sous-population CD4⁺ mémoire centrale (CD45RA⁻, CD27⁺), aucune différence significative est observée entre les réponses du groupe VIH⁺ en comparaison avec le groupe contrôle (figure 46). Dans les deux groupes on constate que l'IL-7 est la seule cytokine à induire une réponse proliférative au sein de ce compartiment (Tableau XIII)

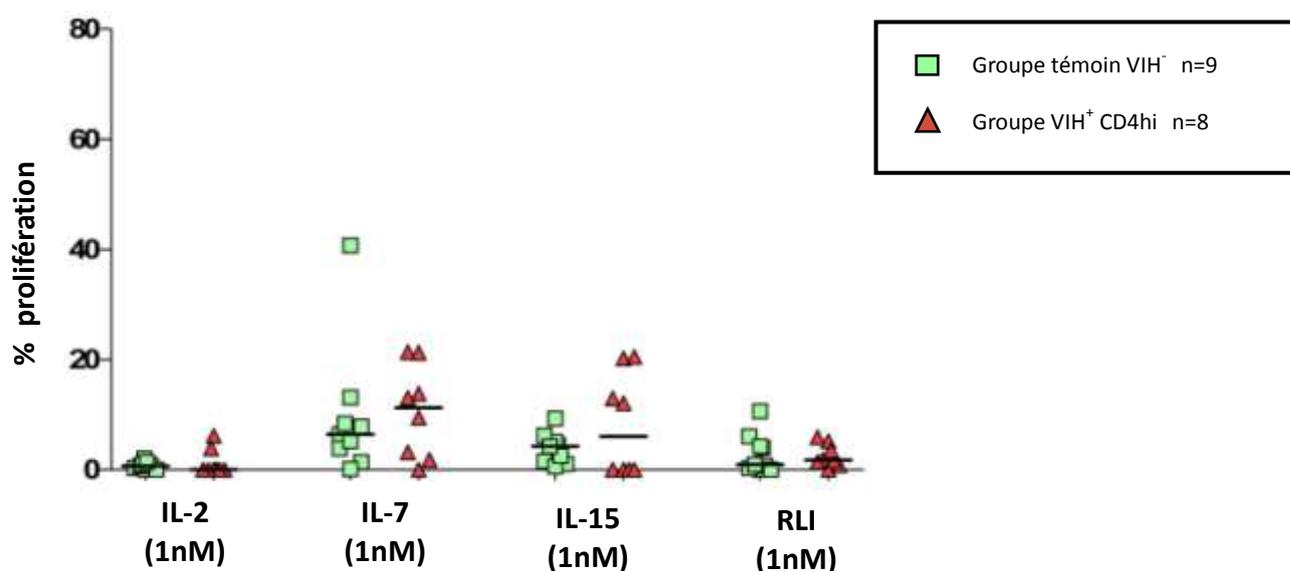


Figure 46: Effet prolifératif d'IL-2, IL-7, IL-15 et RLI sur la sous-population T CD4⁺ mémoire centrale (CD45RA⁻, CD27⁺)

Le pourcentage de prolifération a été calculé après marquage au CFSE. Les valeurs représentées sur la figure représentent le pourcentage de prolifération mesuré moins le pourcentage prolifératif du témoin négatif. La valeur médiane de prolifération est représentée par un trait noir horizontal.

Tableau XIV: Résultats du post test comparant deux à deux les effets des molécules sur les lymphocytes T CD4⁺_{CM} (groupe de patients VIH⁺)

Suite au test ANOVA à mesure répétées qui indique si les effets des cytokines sont significativement différents, un post-test permet la comparaison deux à deux de ces effets.

Comparaisons	P<0,05?	I.C (95%)
T vs IL-2	ns	-7.121 à 4.761
T vs IL-7	*	-16.65 à -4.765
T vs IL-15	ns	-8.676 à 3.206
T vs RLI	ns	-8.658 à 3.225
IL-2 vs IL-7	*	-15.47 à -3.585
IL-2 vs IL-15	ns	-7.496 à 4.386
IL-2 vs RLI	ns	-7.478 à 4.405
IL-7 vs IL-15	*	2.030 à 13.91
IL-7 vs RLI	*	2.049 à 13.93
IL-15 vs RLI	ns	-5.923 à 5.960

*p<0,05

ns : Non significatif

Globalement, nos résultats montrent que l'IL-7 induit de manière efficace la prolifération de toutes les sous-populations des LT CD4⁺. Nous constatons que la sous-population CD4⁺_{EM} des patients VIH⁺ semble répondre de manière moins efficace à la stimulation par l'IL-7.

Par contre, l'IL-15 et le RLI induisent préférentiellement la prolifération de la population CD4⁺_{EM}. Les effets des deux cytokines, IL-7 et IL-15 (et de son super-agoniste RLI) ne sont pas redondants au contraire ils se complètent.

Dans des expériences supplémentaires, nous avons évalué pour 5 patients VIH⁺ les effets sur les sous-populations CD4⁺ de la stimulation par un mélange IL-15 (1nM) et IL-7 (1nM) et on observe que les effets des deux molécules sont additifs (données non montrées).

5. Expression de la chaîne α du récepteur à l'IL-7, le CD127

Dans la littérature, il a été décrit que la perte d'expression de CD127 à la surface des cellules CD4⁺ est associée avec la déplétion des lymphocytes CD4⁺ (Rethi et al., 2005)(Mercier et al., 2008) et donc à la progression de la maladie. Or, dans notre cohorte de patients VIH⁺ il apparaît que les deux groupes de patients VIH⁺ étudiés (CD4_{lo} et CD4_{hi}) présentent, en réponse à l'IL-7, des pourcentages prolifératifs semblables à ceux du groupe témoin (donneurs sains). Nous avons voulu déterminer si la réponse fonctionnelle à l'IL-7, globalement normale, que nous avons observée chez les patients VIH⁺ était accompagnée d'une expression normale du récepteur à l'IL-7, le CD127.

Le pourcentage de cellules exprimant les chaînes α de l'IL-7R (CD127) a été mesuré sur la population CD4⁺ totale ainsi que sur chaque sous-population lymphocytaire TCD4⁺(figure 47).

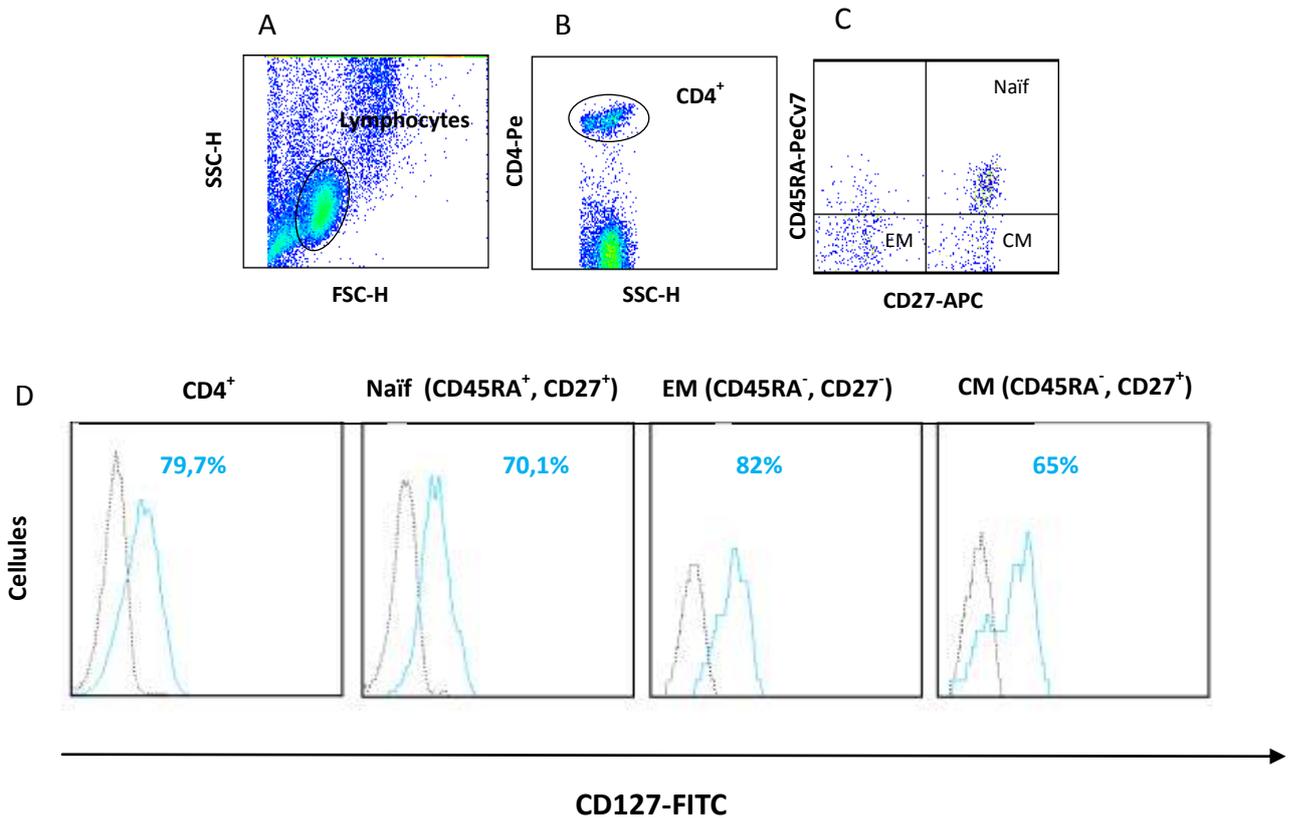


Figure 47: Stratégie d'analyse du niveau d'expression de la molécule CD127

A : Cytogramme représentant la population lymphocytaire identifiés en fonction de leur morphologie (FSC-H X SSC-H).

B : Population de lymphocytes T CD4-Pe⁺

C : Identification des sous-types au sein de la population des Cellules T CD4⁺: Naïfs (CD45RA⁺, CD27⁺); EM (CD45RA⁻, CD27⁻), CM (CD45RA⁻, CD27⁺)

D : Histogrammes représentant l'expression de CD127 au sein des différentes populations cellulaire de gauche à droite : Population CD4⁺ totale, sous-population CD4⁺ Naïfs, CD4⁺_{EM}, CD4⁺_{CM}

La courbe en pointillés noirs représente le marquage témoin négatif (IgG2a murine couplée au FITC)

La courbe bleu turquoise représente le marquage CD127.

La valeur indiquée représente le pourcentage de cellules CD127⁺

Nous ne constatons pas de différence significative d'expression de CD127 sur les lymphocytes CD4⁺ totaux entre les patients infectés par le VIH et les donneurs sains (figure 48).

Le pourcentage d'expression de CD127 mesuré sur les lymphocytes CD4⁺ Naïfs et CD4⁺_{CM}, est comparable entre les deux groupes (figure 49).

Par contre pour la sous-population CD4⁺ mémoire effectrice l'expression du CD127 est plus faible chez les patients VIH⁺ (médiane : 50± 22%) que chez les patients témoins (médiane: 80± 12,5%) (figure 49).

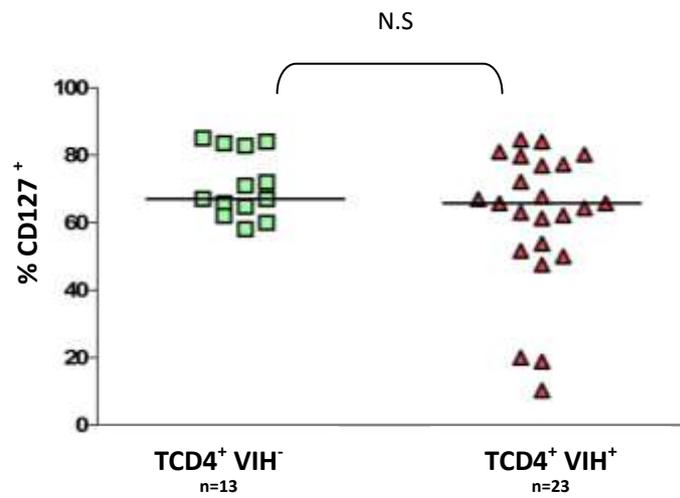


Figure 48: Expression de CD127 par les lymphocytes CD4⁺ totaux

Les traits noirs représentent le pourcentage médian de cellules CD127⁺

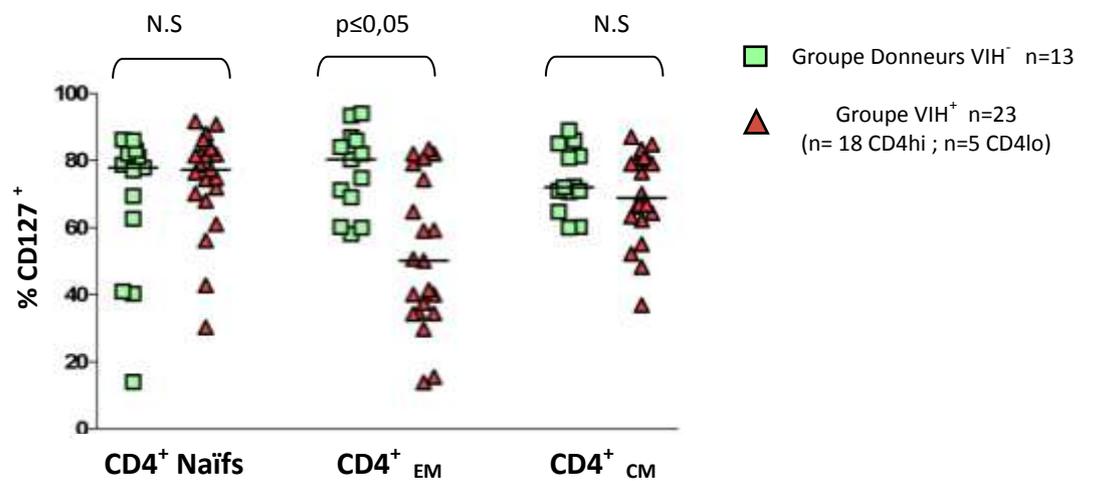


Figure 49: Expression de CD127 au sein des sous-populations des lymphocytes CD4⁺

Les traits noirs représentent le pourcentage médian de cellules CD127⁺

Nous avons ensuite cherché à établir un lien entre le pourcentage d'expression de CD127 sur les différents sous-types CD4⁺ et la progression de la maladie en se basant sur la valeur absolue des lymphocytes CD4⁺ mesurés dans le prélèvement de sang effectué à l'inclusion. Nous observons qu'il existe une forte association entre l'expression de CD127 sur les lymphocytes CD4⁺ Naïfs et CD4⁺_{CM} et la progression de la maladie (figure 50 B et C), tandis que l'expression de CD127 sur les cellules EM est complètement indépendante du taux de CD4 dans le sang.

Cette corrélation entre le taux de CD4 et CD127 explique pourquoi nous n'avons pas observé de diminution de l'expression de CD127 dans les populations N et CM du groupe de patients VIH⁺ analysés. En effet, la plupart de nos patients appartiennent au groupe CD4^{hi}, ils ont en conséquence un taux relativement élevé de LT CD4⁺. Seuls les patients avec un faible taux de T CD4⁺ ont un déficit d'expression de CD127 sur les sous-populations TCD4⁺_N et TCD4⁺_{CM}

Par contre le défaut d'expression de CD127 sur la population EM est général et semble indépendant de la progression de la maladie (figure 50 D)

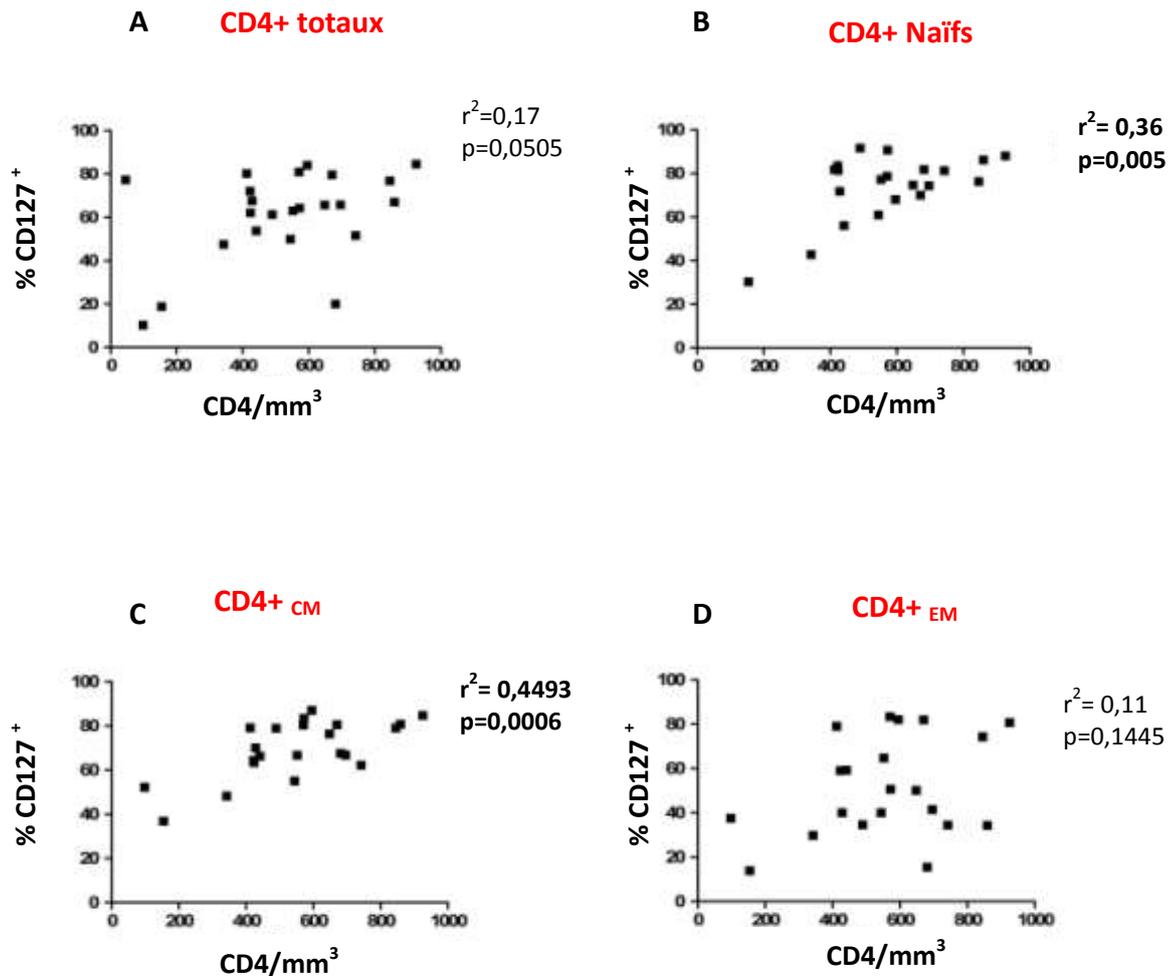


Figure 50 : Corrélations entre la valeur absolue de lymphocytes T CD4⁺ et l'expression de CD127

A : Expression de CD127 mesurée sur les lymphocytes CD4⁺ totaux

B : Expression de CD127 mesurée sur les lymphocytes TCD4⁺ Naïfs

C : Expression de CD127 mesurée sur les lymphocytes TCD4⁺ CM

D : Expression de CD127 mesurée sur les lymphocytes TCD4⁺ EM

La valeur de r représente le coefficient de corrélation et la valeur de p indique la p-value, mesurées par le test de Spearman.

D. Discussion

1. Comparaison IL15/ RLI

L'objectif principal de cette étude était de comparer les effets du RLI, un super-agoniste de l'IL-15, sur les LT CD4⁺ et LT CD8⁺ des patients VIH⁺ à ceux de l'IL-15 native. Nos expériences confirment que sur une lignée cellulaire exprimant seulement les chaînes β et γ du récepteur à l'IL-15, le RLI est 100 fois plus efficace que l'IL-15.

In vivo, l'efficacité du RLI a été mise en évidence dans un modèle murin myélopnique (Huntington et al., 2009), dans une étude qui a montré une meilleure reconstitution des lymphocytes NK en présence du RLI par rapport à l'IL-15. Par ailleurs, dans un modèle murin de mélanome chez la souris immunocompétente, l'activité anti-tumorale du RLI est supérieure à celle de l'IL-15 (Bessard et al., 2009).

Cependant, dans notre étude *in vitro* sur les PBMC des patients VIH⁺ et des donneurs sains, le RLI n'est que légèrement plus efficace que l'IL-15 pour induire la prolifération des LT CD8⁺ et aucune différence n'existe entre la réponse des LTCD4⁺ à l'IL-15 ou au RLI.

Pour expliquer le contraste entre les résultats sur les lignées cellulaires et nos résultats sur les PBMC des patients, l'hypothèse la plus vraisemblable est que parmi les cellules des patients, les monocytes effectuent une transprésentation efficace de l'IL-15. Si tel est le cas, une différence entre le RLI et l'IL-15 ne peut pas être observée dans nos conditions expérimentales.

Même si cette hypothèse n'a pas pu être confirmée lors de notre travail, elle est cohérente avec les résultats obtenus *in vivo* dans les modèles murins. En effet, dans le modèle murin myélopnique les cellules transprésentatrices exprimant IL-15R α doivent être absentes ou rares. Comme le RLI peut s'affranchir des cellules transprésentatrices pour induire correctement un signal par le récepteur $\beta\gamma$, il est normal qu'en leur absence il soit plus efficace que l'IL-15.

Concernant le modèle de mélanome chez la souris immunocompétente, l'évaluation du profil pharmacocinétique du RLI montre une biodisponibilité plasmatique très importante par rapport à celle de l'IL-15. L'efficacité du RLI *in vivo* dans ce cas repose sur l'avantage pharmacocinétique de la molécule plus que sur son mode de présentation. À ce propos, il est intéressant de noter qu'un deuxième super-agoniste de l'IL-15, le ILR, n'est pas plus efficace

que l'IL-15 dans cette étude *in vivo*, malgré une stimulation des cellules Mo7e exprimant seulement IL-15R β et IL-15R γ 100 fois plus efficace que l'IL-15 (Bessard et al., 2009).

Même si dans notre étude le RLI ne montre pas de supériorité en terme d'efficacité fonctionnelle, le fait que cette molécule ait un profil pharmaceutique plus intéressant que l'IL-15 native le place comme un potentiel candidat thérapeutique.

2. Réponse fonctionnelle à l'IL7 et expression de la chaîne α de IL7R

Un des résultats intéressants de notre étude et qui doit être analysé plus en détail, est le fait que les lymphocytes T des groupes VIH⁺ CD4^{hi} et CD4^{lo} aient un niveau de réponse proliférative à l'IL-7 du même ordre de grandeur que le groupe témoin alors qu'un déficit au niveau de la réponse à l'IL-7 a été mis en évidence par plusieurs équipes de chercheurs (Colle et al., 2007) (Bazdar et al. 2009) (Camargo et al., 2009) (Juffroy et al. 2010). De plus, il a été montré que les CD4⁺ des patients VIH⁺ possèdent un niveau d'expression faible de la chaîne α du récepteur à l'IL-7 (CD127) (Rethi et al., 2005) (Koesters et al., 2006) (Colle et al., 2007) (Bazdar et al., 2009) .

En contradiction avec ces études antérieures (Rethi et al. 2005) (Koesters et al. 2006) (Bazdar et al. 2009) nous n'observons pas de différence du niveau d'expression de CD127 entre les CD4 totaux des patients VIH⁺ et ceux des donneurs sains. La discordance entre nos résultats et les données de la littérature, peut être liée aux différences entre les cohortes de patients étudiés. En effet, les publications montrant une réduction globale de l'expression de CD127 sont basées sur des patients ayant un taux de CD4⁺ faible, alors que les patients VIH⁺ recrutés dans notre étude sont majoritairement des patients CD4^{hi}. Plusieurs auteurs ont noté que l'expression de CD127 est corrélée avec le taux de LT CD4⁺ (Rethi et al. 2005) (Koesters et al. 2006) (Bazdar et al. 2009) chez les patients VIH⁺, et cette corrélation explique pourquoi nous n'observons pas de défaut d'expression de CD127 au sein de la population globale de LT CD4⁺.

Par contre, nous avons observé un défaut de l'expression de CD127 dans la sous-population CD4⁺ mémoire effectrice. La diminution de l'expression de CD127 chez des cellules CD4⁺_{EM} n'est pas corrélée à la progression de l'infection, illustrée par le taux de LT CD4⁺ dans le sang périphérique des patients à l'inclusion. Par contre, les proportions des cellules CD4⁺_N et CD4⁺_{CM} exprimant CD127 sont fortement corrélées au nombre absolu de LT CD4⁺. Cette

distinction entre les différentes sous-populations de LT CD4⁺ vis-à-vis de l'expression de CD127 a déjà été signalée par Bazdar et al. (Bazdar et al. 2009). Nos résultats sont également en accord avec certaines études récentes qui montrent que chez les patients virémiques, les LT CD4⁺ mémoires, mais non pas les LT CD4⁺ naïfs, présentent un niveau d'expression de CD127 plus faible que les patients non virémiques et les donneurs sains (Juffroy et al. 2010) (Benito et al. 2008). En ce qui concerne les réponses prolifératives à l'IL-7, nous n'observons pas de diminution de la réponse fonctionnelle à l'IL-7 des cellules CD4⁺ totales des patients VIH⁺. Pour les patients du groupe CD4hi, ce résultat est cohérent avec les données de la littérature, car les déficits d'expression du CD127 et de la réponse fonctionnelle à l'IL-7 s'aggravent avec la progression de la maladie. Par contre, l'observation des niveaux normaux de prolifération en réponse à l'IL-7 pour les LT CD4⁺ des patients du groupe CD4lo est plus surprenante, et s'explique peut-être par les limitations méthodologiques de notre étude.

En effet, des études récentes sur la réponse fonctionnelle des lymphocytes de patients VIH⁺ à l'IL-7 ont analysé la signalisation induite dans les minutes ou les heures qui suivent la stimulation par l'IL-7 par la mesure de la phosphorylation de STAT5. Il s'agit donc d'une réponse précoce à cette stimulation (Bazdar et al. 2009) (Camargo et al. 2009) (Juffroy et al. 2010). Dans notre cas, la réponse fonctionnelle est analysée après sept jours de culture en présence de l'IL-7. Puisque nous n'avons pas rajouté de stimulus antigénique, nous considérons que la réponse observée indique le niveau de prolifération homéostatique aux différentes cytokines. Néanmoins, une partie de la prolifération observée pourrait être due à l'existence d'une réponse spécifique contre l'antigène. D'une part, le milieu de culture contenait du SVF, il est donc possible que pendant le temps de culture cellulaire une réponse spécifique contre les antigènes bovins se développe. D'autre part, il est aussi possible qu'une stimulation par l'antigène ait eu lieu *in vivo*, avant le prélèvement sanguin. En particulier pour les patients VIH⁺ de notre étude, qui étaient virémiques et donc pour lesquels, une réponse T spécifique du VIH doit être en cours. Dans ces deux cas, la présence de cytokines en culture renforce une réponse spécifique à l'antigène en plus d'une prolifération homéostatique ce qui peut fausser les résultats. En particulier, une réponse spécifique au VIH introduirait un biais systématique augmentant le niveau de prolifération observée chez les patients VIH⁺. Cependant, on peut noter que quand les PBMC sont stimulées avec de l'IL-2 le pourcentage de prolifération reste faible, suggérant que ce phénomène d'activation par

les antigènes reste mineur.

De plus, la variabilité intra-groupe des résultats du test CFSE est élevée, ce qui augmente le risque d'une erreur statistique de type II (non-détection d'une différence réelle). Ce problème est particulièrement pertinent quand le nombre d'individus par groupe est faible, ce qui est le cas précisément pour le groupe de patients CD4lo.

Finalement, l'analyse de la réponse proliférative des sous-populations de LT CD4⁺ chez 8 patients du groupe CD4hi a fourni des résultats en cohérence avec les niveaux d'expression du CD127. La prolifération des LT CD4⁺_N et CD4⁺_{CM} en réponse à l'IL-7 est équivalente chez les patients VIH⁺ et les témoins VIH⁻. Par contre, la prolifération des LT CD4⁺_{EM} des patients VIH⁺ montre une forte tendance à être diminuée comparée à celle observée chez les témoins VIH⁻. L'analyse d'un nombre plus important de patients VIH⁺ permettra de déterminer si cette tendance se confirme.

L'ensemble de nos résultats indique que les défauts d'expression de CD127 et de réponse fonctionnelle à l'IL-7 sont plus marqués dans la sous-population LT CD4⁺_{EM}. Cette conclusion est cohérente avec les résultats de Bazdar *et al.*, et avec les résultats des études cliniques montrant une bonne reconstitution du compartiment CD4⁺ préférentiellement des lymphocytes CD4⁺_N et CD4⁺_{CM}, après une thérapie par l'IL-7 (Sereti *et al.* 2009) (Levy *et al.* 2009).

3. IL-15 et RLI : Candidats pour une thérapie de l'infection par le VIH ?

Dans notre étude sur les sous-populations LT CD4⁺, il apparaît que l'IL-15 et le RLI stimulent spécifiquement la prolifération du compartiment CD4⁺_{EM}. Cette observation avait déjà été faite dans le modèle macaque infecté (Picker *et al.*, 2006) et présente un intérêt particulier dans le champ thérapeutique du VIH. En effet, la population CD4⁺_{EM} est fortement atteinte lors de la phase aiguë de VIH, car elle est principalement présente dans les sites de réplication virale (muqueuses, y compris la lamina propia de l'intestin) (Sallusto *et al.*, 2004). La régénération de ce compartiment reste insuffisant durant le traitement de l'infection (Mehandru *et al.*, 2006).

Parmi les différentes sous-populations de LT CD4⁺, il semble que ce sont les LT CD4⁺_{EM} qui

montrent le déficit le plus sévère d'expression du CD127 et de la réponse fonctionnelle à l'IL-7. Dans ce cas l'IL-15 ou le RLI pourraient apparaître comme des bons candidats pour reconstituer cette sous-population chez les patients VIH⁺.

Nos résultats sur les LTCD4⁺_{EM} rappellent certaines observations effectués chez les LTCD8⁺. En particulier il existe une sous-population de LT CD8⁺ exprimant des niveaux faibles de CD127, qui montrent un phénotype dit «d'épuisement» et qui sont incapables de proliférer sous l'IL-7. L'IL-15 semble indispensable pour maintenir ce type cellulaire vivant, et restaure la capacité de ces cellules à répondre à l'activation via le TCR (Kim et al. 2007).

Des études précliniques sur la toxicité et les effets immunomodulateurs de l'IL-15 sur des macaques ont montré que l'administration intermittente de l'IL-15 est bien tolérée par les animaux traités et que l'IL-15 induit une expansion des lymphocytes CD8⁺ et CD4⁺ mémoires (Berger et al., 2009) (Picker et al., 2006)

Toutes ces considérations sont en faveur d'une utilisation possible de l'IL-15 comme une nouvelle approche thérapeutique pour la restauration de la population CD4⁺_{EM}, et le renforcement de la réponse CTL et NK anti-virale dans le cadre de l'infection par le VIH. De plus, du fait de sa meilleure biodisponibilité, le RLI pourrait être considéré comme un meilleur candidat que l'IL-15.

Cependant des études effectuées dans le modèle de macaques infectés par le SIV et traités en phase aiguë par l'IL-15 aboutissent à un "set point" viral plus élevé que chez les macaques non-traités par l'IL-15, et accélère la progression de la maladie. Ces résultats indiquent que la thérapie par l'IL-15 serait associée à des risques d'aggravation de la progression de la maladie. Il est donc clair que l'IL-15 ne pourra être utilisé en thérapie de l'infection que si la charge virale est totalement contrôlée par un traitement antirétroviral.

E. Conclusions et perspectives

Dans cette étude nous avons montré que l'IL-7 et l'IL-15 peuvent avoir un rôle thérapeutique intéressant à approfondir dans le cadre de la reconstitution immunologique dans l'infection du VIH :

- D'une part l'IL-7 apparaît comme le meilleur candidat pour reconstituer les populations CD4⁺ naïfs et CD4⁺_{CM}. Chez les patients VIH⁺, ayant plus de 500 CD4⁺, ces sous-populations ne présentent pas de défauts d'expression du CD127 ni de réponse fonctionnelle à l'IL-7.
- Les LT CD4⁺_{EM} des patients infectés présentent un défaut d'expression de CD127 et semblent avoir une réponse fonctionnelle à l'IL-7 moins efficace que celle du groupe témoin.
- L'IL-15 et son super agoniste le RLI présentent un potentiel dans la reconstitution de la sous-population LT CD4⁺_{EM}. Cette population est susceptible car elle est une cible préférentielle du VIH. Pour la reconstitution de cette sous-population chez des patients sous ART, l'IL-15 ou le RLI ne peuvent être envisagés que dans le cadre d'une thérapie adjuvante.

V. Conclusion

Le traitement efficace du VIH et les progrès effectués en termes d'accessibilité aux médicaments des personnes infectées font de nos jours de l'infection par le VIH une maladie non plus létale mais une infection chronique traitée à vie. Cependant, les traitements actuels ne permettent pas d'éradiquer le virus et sont en général lourds avec des effets secondaires importants.

Des complications peuvent survenir lors du suivi médical, le patient peut rencontrer des échecs thérapeutiques, soit virologique soit immunologique. Dans ce cadre, les recherches s'orientent vers des nouvelles pistes, en particulier pour trouver des thérapies synergiques avec les traitements antirétroviraux visant à préserver le compartiment lymphocytaire et éviter la progression de la maladie ainsi que le maintien et la stimulation d'une réponse immunitaire spécifique contre le VIH.

Les travaux décrits précédemment, s'inscrivent spécifiquement dans ce contexte

L'objectif principale du projet sur la réponse CTL spécifique contre un épitope de la RT virale était de savoir si la réponse CTL contre l'épitope YV9 était maintenue et pouvait être efficace contre le virus résistant à la 3TC. En effet, la Lamivudine était jusqu'en 2009 un des INTI prescrit en première ligne de traitement en France. En Afrique Subsaharienne, elle reste un des antirétroviraux basiques du traitement de l'infection. Parvenir à empêcher ou réduire l'échec virologique sous cette molécule par le biais d'une immunothérapie nous semble une approche intéressante. Les résultats décrits ici montrent que la réponse est rare dans le groupe de patients en échec virologique. Mais l'analyse détaillée des facteurs impliqués dans la génération de cette réponse ainsi que l'identification de l'épitope préférentiellement reconnu dans le contexte HLA-A2 ouvrent la porte à des nouvelles voies immunothérapeutiques visant à générer une réponse efficace contre cet épitope. Notre approche a été confortée par l'intérêt que le clone 8D10 a suscité auprès de la start-up anglaise spécialisée en immunothérapie.

Le projet sur les interleukines de la chaîne γ commune pour lutter contre l'échec immunologique nous montre essentiellement que cette approche reste valide malgré les résultats décourageants obtenus sur l'IL-2 et malgré les déficits au niveau du système IL-7/IL-7R observés chez les patients VIH⁺. Nos résultats indiquent que seule la sous-population CD4⁺_{EM} aurait un dysfonctionnement dans ce système et suggèrent que l'IL-15 pourrait avoir un rôle dans la reconstitution de ce compartiment.

VI. Bibliographie

- Aasa-Chapman, M. M. I., Hayman, A., Newton, P., Cornforth, D., Williams, I., Borrow, P., Balfe, P., et McKnight, A. (2004). Development of the antibody response in acute HIV-1 infection. *AIDS* 18, 371-381.
- Abrams, D., Lévy, Y., Losso, M. H., Babiker, A., Collins, G., Cooper, D. A., Darbyshire, J., Emery, S., Fox, L., Gordin, F., et al. (2009). Interleukin-2 therapy in patients with HIV infection. *N. Engl. J. Med* 361, 1548-1559.
- Adamson, C. S., et Freed, E. O. (2007). Human Immunodeficiency Virus Type 1 Assembly, Release, and Maturation. Dans HIV[hyphen (true graphic)]1: Molecular Biology and Pathogenesis Viral Mechanisms, Second Edition (Academic Press), p. 347-387. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/B7CTJ-4P188SN-B/2/a4fe767b42f3ea9a46caf01b0bc022a7> [Accédé Juillet 21, 2010].
- Addo, M. M., Yu, X. G., Rathod, A., Cohen, D., Eldridge, R. L., Strick, D., Johnston, M. N., Corcoran, C., Wurcel, A. G., Fitzpatrick, C. A., et al. (2003). Comprehensive Epitope Analysis of Human Immunodeficiency Virus Type 1 (HIV-1)-Specific T-Cell Responses Directed against the Entire Expressed HIV-1 Genome Demonstrate Broadly Directed Responses, but No Correlation to Viral Load. *J. Virol.* 77, 2081-2092.
- Ait-Khaled, M., Stone, C., Amphlett, G., Clotet, B., Staszewski, S., Katlama, C., et Tisdale, M. (2002). M184V is associated with a low incidence of thymidine analogue mutations and low phenotypic resistance to zidovudine and stavudine. *AIDS* 16, 1686-1689.
- Alcamí, J., Laín de Lera, T., Folgueira, L., Pedraza, M. A., Jacqué, J. M., Bachelierie, F., Noriega, A. R., Hay, R. T., Harrich, D., et Gaynor, R. B. (1995). Absolute dependence on kappa B responsive elements for initiation and Tat-mediated amplification of HIV transcription in blood CD4 T lymphocytes. *EMBO J* 14, 1552-1560.
- Alce, T. M., et Popik, W. (2004). APOBEC3G is incorporated into virus-like particles by a direct interaction with HIV-1 Gag nucleocapsid protein. *J. Biol. Chem* 279, 34083-34086.
- Alkhatib, G., Combadiere, C., Broder, C. C., Feng, Y., Kennedy, P. E., Murphy, P. M., et Berger, E. A. (1996). CC CKR5: a RANTES, MIP-1alpha, MIP-1beta receptor as a fusion cofactor for macrophage-tropic HIV-1. *Science* 272, 1955-1958.
- Alkhatib, G. (2009). The biology of CCR5 and CXCR4. *Curr Opin HIV AIDS* 4, 96-103.
- Almeida, J. R., Sauce, D., Price, D. A., Papagno, L., Shin, S. Y., Moris, A., Larsen, M., Pancino, G., Douek, D. C., Autran, B., et al. (2009). Antigen sensitivity is a major determinant of CD8+ T-cell polyfunctionality and HIV-suppressive activity. *Blood* 113, 6351-6360.
- Appay, V., Nixon, D. F., Donahoe, S. M., Gillespie, G. M., Dong, T., King, A., Ogg, G. S., Spiegel, H. M., Conlon, C., Spina, C. A., et al. (2000). HIV-specific CD8(+) T cells produce antiviral cytokines but are impaired in cytolytic function. *J. Exp. Med* 192, 63-75.

- Arduino, R. C., Nannini, E. C., Rodriguez-Barradas, M., Schrader, S., Losso, M., Ruxrungtham, K., Allende, M. C., Emery, S., Fosdick, L., Neaton, J., et al. (2004). CD4 cell response to 3 doses of subcutaneous interleukin 2: meta-analysis of 3 Vanguard studies. *Clin. Infect. Dis* 39, 115-122.
- Arfi, V., Lienard, J., Nguyen, X., Berger, G., Rigal, D., Darlix, J., et Cimarelli, A. (2009). Characterization of the behavior of functional viral genomes during the early steps of human immunodeficiency virus type 1 infection. *J. Virol* 83, 7524-7535.
- Arhel, N. J., Souquere-Besse, S., Munier, S., Souque, P., Guadagnini, S., Rutherford, S., Prévost, M., Allen, T. D., et Charneau, P. (2007). HIV-1 DNA Flap formation promotes uncoating of the pre-integration complex at the nuclear pore. *EMBO J* 26, 3025-3037.
- Arnó, A., Ruiz, L., Juan, M., Jou, A., Balagué, M., Zayat, M. K., Marfil, S., Martínez-Picado, J., Martínez, M. A., Romeu, J., et al. (1999). Efficacy of low-dose subcutaneous interleukin-2 to treat advanced human immunodeficiency virus type 1 in persons with $\leq 250/\mu\text{L}$ CD4 T cells and undetectable plasma virus load. *J. Infect. Dis* 180, 56-60.
- Atedzoe, B. N., Ahmad, A., et Menezes, J. (1997). Enhancement of natural killer cell cytotoxicity by the human herpesvirus-7 via IL-15 induction. *J. Immunol* 159, 4966-4972.
- Back, N. K., Nijhuis, M., Keulen, W., Boucher, C. A., Oude Essink, B. O., van Kuilenburg, A. B., van Gennip, A. H., et Berkhout, B. (1996). Reduced replication of 3TC-resistant HIV-1 variants in primary cells due to a processivity defect of the reverse transcriptase enzyme. *EMBO J* 15, 4040-4049.
- Baker, J. V., Peng, G., Rapkin, J., Abrams, D. I., Silverberg, M. J., MacArthur, R. D., Cavert, W. P., Henry, W. K., et Neaton, J. D. (2008). CD4+ count and risk of non-AIDS diseases following initial treatment for HIV infection. *AIDS* 22, 841-848.
- Barré-Sinoussi, F., Chermann, J. C., Rey, F., Nugeyre, M. T., Chamaret, S., Gruest, J., Dautuet, C., Axler-Blin, C., Vézinet-Brun, F., Rouzioux, C., et al. (1983). Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* 220, 868-871.
- Basu, V. P., Song, M., Gao, L., Rigby, S. T., Hanson, M. N., et Bambara, R. A. (2008). Strand transfer events during HIV-1 reverse transcription. *Virus Res* 134, 19-38.
- Bazdar, D. A., Kalinowska, M., et Sieg, S. F. (2009). Interleukin-7 receptor signaling is deficient in CD4+ T cells from HIV-infected persons and is inversely associated with aging. *J. Infect. Dis* 199, 1019-1028.
- Belzile, J., Duisit, G., Rougeau, N., Mercier, J., Finzi, A., et Cohen, E. A. (2007). HIV-1 Vpr-mediated G2 arrest involves the DDB1-CUL4AVPRBP E3 ubiquitin ligase. *PLoS Pathog* 3, e85.

- Benito, J. M., López, M., Lozano, S., González-Lahoz, J., et Soriano, V. (2008). Down-regulation of interleukin-7 receptor (CD127) in HIV infection is associated with T cell activation and is a main factor influencing restoration of CD4(+) cells after antiretroviral therapy. *J. Infect. Dis* *198*, 1466-1473.
- Benito, J. M., López, M., Lozano, S., Ballesteros, C., Martinez, P., González-Lahoz, J., et Soriano, V. (2005). Differential upregulation of CD38 on different T-cell subsets may influence the ability to reconstitute CD4+ T cells under successful highly active antiretroviral therapy. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr* *38*, 373-381.
- Benveniste, O., Flahault, A., Rollot, F., Elbim, C., Estaquier, J., Pédrón, B., Duval, X., Dereuddre-Bosquet, N., Clayette, P., Sterkers, G., et al. (2005). Mechanisms Involved in the Low-Level Regeneration of CD4+ Cells in HIV-1-Infected Patients Receiving Highly Active Antiretroviral Therapy Who Have Prolonged Undetectable Plasma Viral Loads. *The Journal of Infectious Diseases* *191*, 1670-1679.
- Beq, S., Nugeyre, M., Ho Tsong Fang, R., Gautier, D., Legrand, R., Schmitt, N., Estaquier, J., Barré-Sinoussi, F., Hurtrel, B., Cheynier, R., et al. (2006). IL-7 induces immunological improvement in SIV-infected rhesus macaques under antiviral therapy. *J. Immunol* *176*, 914-922.
- Berger, C., Berger, M., Hackman, R. C., Gough, M., Elliott, C., Jensen, M. C., et Riddell, S. R. (2009). Safety and immunologic effects of IL-15 administration in nonhuman primates. *Blood* *114*, 2417-2426.
- Berger, E. A., Murphy, P. M., et Farber, J. M. (1999). Chemokine receptors as HIV-1 coreceptors: roles in viral entry, tropism, and disease. *Annu. Rev. Immunol* *17*, 657-700.
- Berkhout, B., et Jeang, K. T. (1989). trans activation of human immunodeficiency virus type 1 is sequence specific for both the single-stranded bulge and loop of the trans-acting-responsive hairpin: a quantitative analysis. *J. Virol* *63*, 5501-5504.
- Bessard, A., Solé, V., Bouchaud, G., Quémener, A., et Jacques, Y. (2009). High antitumor activity of RLI, an interleukin-15 (IL-15)-IL-15 receptor alpha fusion protein, in metastatic melanoma and colorectal cancer. *Mol. Cancer Ther* *8*, 2736-2745.
- de Béthune, M. (2010). Non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NNRTIs), their discovery, development, and use in the treatment of HIV-1 infection: A review of the last 20 years (1989-2009). *Antiviral Research* *85*, 75-90.
- Betts, M. R., Nason, M. C., West, S. M., De Rosa, S. C., Migueles, S. A., Abraham, J., Lederman, M. M., Benito, J. M., Goepfert, P. A., Connors, M., et al. (2006). HIV nonprogressors preferentially maintain highly functional HIV-specific CD8+ T cells. *Blood* *107*, 4781-4789.

- Bhattacharya, J., Peters, P. J., et Clapham, P. R. (2003). CD4-independent infection of HIV and SIV: implications for envelope conformation and cell tropism in vivo. *AIDS 17 Suppl 4*, S35-43.
- Bihl, F., Frahm, N., Di Giammarino, L., Sidney, J., John, M., Yusim, K., Woodberry, T., Sango, K., Hewitt, H. S., Henry, L., et al. (2006). Impact of HLA-B alleles, epitope binding affinity, functional avidity, and viral coinfection on the immunodominance of virus-specific CTL responses. *J. Immunol 176*, 4094-4101.
- Boaz, M. J., Waters, A., Murad, S., Easterbrook, P. J., et Vyakarnam, A. (2002). Presence of HIV-1 Gag-Specific IFN- γ +IL-2+ and CD28+IL-2+ CD4 T Cell Responses Is Associated with Nonprogression in HIV-1 Infection. *J Immunol 169*, 6376-6385.
- Boissonnas, A., Bonduelle, O., Antzack, A., Lone, Y., Gache, C., Debre, P., Autran, B., et Combadière, B. (2002). In vivo priming of HIV-specific CTLs determines selective cross-reactive immune responses against poorly immunogenic HIV-natural variants. *J. Immunol 169*, 3694-3699.
- Borrow, P., Lewicki, H., Hahn, B. H., Shaw, G. M., et Oldstone, M. B. (1994). Virus-specific CD8+ cytotoxic T-lymphocyte activity associated with control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 infection. *J. Virol 68*, 6103-6110.
- Boucher, C. A., Cammack, N., Schipper, P., Schuurman, R., Rouse, P., Wainberg, M. A., et Cameron, J. M. (1993). High-level resistance to (-) enantiomeric 2'-deoxy-3'-thiacytidine in vitro is due to one amino acid substitution in the catalytic site of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase. *Antimicrob. Agents Chemother 37*, 2231-2234.
- Boudet, F., Lecoœur, H., et Gougeon, M. L. (1996). Apoptosis associated with ex vivo down-regulation of Bcl-2 and up-regulation of Fas in potential cytotoxic CD8+ T lymphocytes during HIV infection. *J. Immunol 156*, 2282-2293.
- Boyman, O., Purton, J. F., Surh, C. D., et Sprent, J. (2007). Cytokines and T-cell homeostasis. *Curr. Opin. Immunol 19*, 320-326.
- Brenchley, J. M., Price, D. A., Schacker, T. W., Asher, T. E., Silvestri, G., Rao, S., Kazzaz, Z., Bornstein, E., Lambotte, O., Altmann, D., et al. (2006). Microbial translocation is a cause of systemic immune activation in chronic HIV infection. *Nat. Med 12*, 1365-1371.
- Brenchley, J. M., Schacker, T. W., Ruff, L. E., Price, D. A., Taylor, J. H., Beilman, G. J., Nguyen, P. L., Khoruts, A., Larson, M., Haase, A. T., et al. (2004). CD4+ T cell depletion during all stages of HIV disease occurs predominantly in the gastrointestinal tract. *J. Exp. Med 200*, 749-759.

- Brenner, B. G., Routy, J., Petrella, M., Moisi, D., Oliveira, M., Detorio, M., Spira, B., Essabag, V., Conway, B., Lalonde, R., et al. (2002). Persistence and fitness of multidrug-resistant human immunodeficiency virus type 1 acquired in primary infection. *J. Virol* 76, 1753-1761.
- Briggs, J. A. G., Simon, M. N., Gross, I., Kräusslich, H., Fuller, S. D., Vogt, V. M., et Johnson, M. C. (2004). The stoichiometry of Gag protein in HIV-1. *Nat. Struct. Mol. Biol* 11, 672-675.
- Bukrinskaya, A. G. (2004). HIV-1 assembly and maturation. *Arch. Virol* 149, 1067-1082.
- Bukrinsky, M. (2004). A Hard Way to the Nucleus. *Mol Med* 10, 1-5.
- Burton, D. R., Desrosiers, R. C., Doms, R. W., Koff, W. C., Kwong, P. D., Moore, J. P., Nabel, G. J., Sodroski, J., Wilson, I. A., et Wyatt, R. T. (2004). HIV vaccine design and the neutralizing antibody problem. *Nat. Immunol* 5, 233-236.
- Calarese, D. A., Scanlan, C. N., Zwick, M. B., Deechongkit, S., Mimura, Y., Kunert, R., Zhu, P., Wormald, M. R., Stanfield, R. L., Roux, K. H., et al. (2003). Antibody domain exchange is an immunological solution to carbohydrate cluster recognition. *Science* 300, 2065-2071.
- Camargo, J. F., Kulkarni, H., Agan, B. K., Gaitan, A. A., Beachy, L. A., Srinivas, S., He, W., Anderson, S., Marconi, V. C., Dolan, M. J., et al. (2009). Responsiveness of T cells to interleukin-7 is associated with higher CD4+ T cell counts in HIV-1-positive individuals with highly active antiretroviral therapy-induced viral load suppression. *J. Infect. Dis* 199, 1872-1882.
- Cane, P. A. (2005). Stability of transmitted drug-resistant HIV-1 species. *Curr. Opin. Infect. Dis* 18, 537-542.
- Cao, Y., Qin, L., Zhang, L., Safrin, J., et Ho, D. D. (1995). Virologic and immunologic characterization of long-term survivors of human immunodeficiency virus type 1 infection. *N. Engl. J. Med* 332, 201-208.
- Carrington, M., et O'Brien, S. J. (2003). The influence of HLA genotype on AIDS. *Annu. Rev. Med* 54, 535-551.
- Cartier, C., Sivard, P., Tranchat, C., Decimo, D., Desgranges, C., et Boyer, V. (1999). Identification of three major phosphorylation sites within HIV-1 capsid. Role of phosphorylation during the early steps of infection. *J. Biol. Chem* 274, 19434-19440.
- Casazza, J. P., Betts, M. R., Picker, L. J., et Koup, R. A. (2001). Decay kinetics of human immunodeficiency virus-specific CD8+ T cells in peripheral blood after initiation of highly active antiretroviral therapy. *J. Virol* 75, 6508-6516.

- Chan, D. C., Fass, D., Berger, J. M., et Kim, P. S. (1997). Core structure of gp41 from the HIV envelope glycoprotein. *Cell* *89*, 263-273.
- Chehimi, J., Marshall, J. D., Salvucci, O., Frank, I., Chehimi, S., Kawecki, S., Bacheller, D., Rifat, S., et Chouaib, S. (1997). IL-15 enhances immune functions during HIV infection. *J. Immunol* *158*, 5978-5987.
- Choe, H., Farzan, M., Sun, Y., Sullivan, N., Rollins, B., Ponath, P. D., Wu, L., Mackay, C. R., LaRosa, G., Newman, W., et al. (1996). The beta-chemokine receptors CCR3 and CCR5 facilitate infection by primary HIV-1 isolates. *Cell* *85*, 1135-1148.
- Clavel, F., Guétard, D., Brun-Vézinet, F., Chamaret, S., Rey, M. A., Santos-Ferreira, M. O., Laurent, A. G., Dauguet, C., Katlama, C., et Rouzioux, C. (1986). Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS. *Science* *233*, 343-346.
- Cohen, E. A., Dehni, G., Sodroski, J. G., et Haseltine, W. A. (1990). Human immunodeficiency virus vpr product is a virion-associated regulatory protein. *J. Virol* *64*, 3097-3099.
- Coiras, M., Lopez-Huertas, M. R., Perez-Olmeda, M., et Alcami, J. (2009). Understanding HIV-1 latency provides clues for the eradication of long-term reservoirs. *Nat Rev Micro* *7*, 798-812.
- Colle, J., Moreau, J., Fontanet, A., Lambotte, O., Delfraissy, J., et Thèze, J. (2007). The correlation between levels of IL-7 α expression and responsiveness to IL-7 is lost in CD4 lymphocytes from HIV-infected patients. *AIDS* *21*, 101-103.
- Crawford, H., Prado, J. G., Leslie, A., Hué, S., Honeyborne, I., Reddy, S., van der Stok, M., Mncube, Z., Brander, C., Rousseau, C., et al. (2007). Compensatory mutation partially restores fitness and delays reversion of escape mutation within the immunodominant HLA-B*5703-restricted Gag epitope in chronic human immunodeficiency virus type 1 infection. *J. Virol* *81*, 8346-8351.
- Cullen, B. R. (1990). The HIV-1 Tat protein: an RNA sequence-specific processivity factor? *Cell* *63*, 655-657.
- Cullen, B. R. (2006). Role and mechanism of action of the APOBEC3 family of antiretroviral resistance factors. *J. Virol* *80*, 1067-1076.
- Dalod, M., Harzic, M., Pellegrin, I., Dumon, B., Hoen, B., Sereni, D., Deschemin, J. C., Levy, J. P., Venet, A., et Gomard, E. (1998). Evolution of cytotoxic T lymphocyte responses to human immunodeficiency virus type 1 in patients with symptomatic primary infection receiving antiretroviral triple therapy. *J. Infect. Dis* *178*, 61-69.

- Daniel, M. D., Kirchhoff, F., Czajak, S. C., Sehgal, P. K., et Desrosiers, R. C. (1992). Protective effects of a live attenuated SIV vaccine with a deletion in the nef gene. *Science* 258, 1938-1941.
- Daucher, M., Price, D. A., Brenchley, J. M., Lamoreaux, L., Metcalf, J. A., Rehm, C., Nies-Kraske, E., Urban, E., Yoder, C., Rock, D., et al. (2008). Virological outcome after structured interruption of antiretroviral therapy for human immunodeficiency virus infection is associated with the functional profile of virus-specific CD8+ T cells. *J. Virol* 82, 4102-4114.
- Davey, R. T., Chaitt, D. G., Albert, J. M., Piscitelli, S. C., Kovacs, J. A., Walker, R. E., Falloon, J., Polis, M. A., Metcalf, J. A., Masur, H., et al. (1999). A randomized trial of high- versus low-dose subcutaneous interleukin-2 outpatient therapy for early human immunodeficiency virus type 1 infection. *J. Infect. Dis* 179, 849-858.
- David, D., Naït-Ighil, L., Dupont, B., Maral, J., Gachot, B., et Thèze, J. (2001). Rapid effect of interleukin-2 therapy in human immunodeficiency virus-infected patients whose CD4 cell counts increase only slightly in response to combined antiretroviral treatment. *J. Infect. Dis* 183, 730-735.
- Day, C. L., Kaufmann, D. E., Kiepiela, P., Brown, J. A., Moodley, E. S., Reddy, S., Mackey, E. W., Miller, J. D., Leslie, A. J., DePierres, C., et al. (2006). PD-1 expression on HIV-specific T cells is associated with T-cell exhaustion and disease progression. *Nature* 443, 350-354.
- Dela Cruz, C. S., Tan, R., Rowland-Jones, S. L., et Barber, B. H. (2000). Creating HIV-1 reverse transcriptase cytotoxic T lymphocyte target structures by HLA-A2 heavy chain modifications. *Int. Immunol* 12, 1293-1302.
- Delelis, O., Carayon, K., Saïb, A., Deprez, E., et Mouscadet, J. (2008). Integrase and integration: biochemical activities of HIV-1 integrase. *Retrovirology* 5, 114.
- Deng, L., de la Fuente, C., Fu, P., Wang, L., Donnelly, R., Wade, J. D., Lambert, P., Li, H., Lee, C. G., et Kashanchi, F. (2000). Acetylation of HIV-1 Tat by CBP/P300 increases transcription of integrated HIV-1 genome and enhances binding to core histones. *Virology* 277, 278-295.
- Descamps, D., Flandre, P., Calvez, V., Peytavin, G., Meiffredy, V., Collin, G., Delaugerre, C., Robert-Delmas, S., Bazin, B., Aboulker, J. P., et al. (2000). Mechanisms of virologic failure in previously untreated HIV-infected patients from a trial of induction-maintenance therapy. Trilège (Agence Nationale de Recherches sur le SIDA 072) Study Team). *JAMA* 283, 205-211.
- Dinges, W. L., Richardt, J., Friedrich, D., Jalbert, E., Liu, Y., Stevens, C. E., Maenza, J., Collier, A. C., Geraghty, D. E., Smith, J., et al. (2010). Virus-specific CD8+ T-cell responses better define HIV disease progression than HLA genotype. *J. Virol* 84, 4461-4468.

- Douek, D. C., Picker, L. J., et Koup, R. A. (2003). T cell dynamics in HIV-1 infection. *Annu. Rev. Immunol* 21, 265-304.
- Douglas, J. L., Viswanathan, K., McCarroll, M. N., Gustin, J. K., Früh, K., et Moses, A. V. (2009). Vpu directs the degradation of the human immunodeficiency virus restriction factor BST-2/Tetherin via a β TrCP-dependent mechanism. *J. Virol* 83, 7931-7947.
- Draenert, R., Le Gall, S., Pfafferott, K. J., Leslie, A. J., Chetty, P., Brander, C., Holmes, E. C., Chang, S., Feeney, M. E., Addo, M. M., et al. (2004). Immune selection for altered antigen processing leads to cytotoxic T lymphocyte escape in chronic HIV-1 infection. *J. Exp. Med* 199, 905-915.
- Dragic, T., Litwin, V., Allaway, G. P., Martin, S. R., Huang, Y., Nagashima, K. A., Cayanan, C., Maddon, P. J., Koup, R. A., Moore, J. P., et al. (1996). HIV-1 entry into CD4+ cells is mediated by the chemokine receptor CC-CKR-5. *Nature* 381, 667-673.
- Dunham, R. M., Cervasi, B., Brenchley, J. M., Albrecht, H., Weintrob, A., Sumpter, B., Engram, J., Gordon, S., Klatt, N. R., Frank, I., et al. (2008). CD127 and CD25 expression defines CD4+ T cell subsets that are differentially depleted during HIV infection. *J. Immunol* 180, 5582-5592.
- Dzutsev, A. H., Belyakov, I. M., Isakov, D. V., Margulies, D. H., et Berzofsky, J. A. (2007). Avidity of CD8 T cells sharpens immunodominance. *Int. Immunol* 19, 497-507.
- Egger, M., May, M., Chêne, G., Phillips, A. N., Ledergerber, B., Dabis, F., Costagliola, D., D'Arminio Monforte, A., de Wolf, F., Reiss, P., et al. (2002). Prognosis of HIV-1-infected patients starting highly active antiretroviral therapy: a collaborative analysis of prospective studies. *Lancet* 360, 119-129.
- Emu, B., Sinclair, E., Favre, D., Moretto, W. J., Hsue, P., Hoh, R., Martin, J. N., Nixon, D. F., McCune, J. M., et Deeks, S. G. (2005). Phenotypic, functional, and kinetic parameters associated with apparent T-cell control of human immunodeficiency virus replication in individuals with and without antiretroviral treatment. *J. Virol* 79, 14169-14178.
- Eron, J. J. (1996). The treatment of antiretroviral-naive subjects with the 3TC/zidovudine combination: a review of North American (NUCA 3001) and European (NUCB 3001) trials. *AIDS* 10 Suppl 5, S11-19.
- Feng, Y., Broder, C. C., Kennedy, P. E., et Berger, E. A. (1996). HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor. *Science* 272, 872-877.
- Fischer, U., Huber, J., Boelens, W. C., Mattaj, I. W., et Lührmann, R. (1995). The HIV-1 Rev activation domain is a nuclear export signal that accesses an export pathway used by specific cellular RNAs. *Cell* 82, 475-483.

- Flamand, L., Stefanescu, I., et Menezes, J. (1996). Human herpesvirus-6 enhances natural killer cell cytotoxicity via IL-15. *J. Clin. Invest* 97, 1373-1381.
- Fluur, C., De Milito, A., Fry, T. J., Vivar, N., Eidsmo, L., Atlas, A., Federici, C., Matarrese, P., Logozzi, M., Rajnavölgyi, E., et al. (2007). Potential role for IL-7 in Fas-mediated T cell apoptosis during HIV infection. *J. Immunol* 178, 5340-5350.
- Fontenot, J. D., et Rudensky, A. Y. (2005). A well adapted regulatory contrivance: regulatory T cell development and the forkhead family transcription factor Foxp3. *Nat. Immunol* 6, 331-337.
- Freed, E. O. (1998). HIV-1 gag proteins: diverse functions in the virus life cycle. *Virology* 251, 1-15.
- Freed, E. O. (2001). HIV-1 replication. *Somat. Cell Mol. Genet* 26, 13-33.
- Frost, S. D. W., Wrin, T., Smith, D. M., Pond, S. L. K., Liu, Y., Paxinos, E., Chappey, C., Galovich, J., Beauchaine, J., Petropoulos, C. J., et al. (2005). Neutralizing antibody responses drive the evolution of human immunodeficiency virus type 1 envelope during recent HIV infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 18514-18519.
- Fry, T. J., Moniuszko, M., Creekmore, S., Donohue, S. J., Douek, D. C., Giardina, S., Hecht, T. T., Hill, B. J., Komschlies, K., Tomaszewski, J., et al. (2003). IL-7 therapy dramatically alters peripheral T-cell homeostasis in normal and SIV-infected nonhuman primates. *Blood* 101, 2294-2299.
- Fung, H. B., et Guo, Y. (2004). Enfuvirtide: a fusion inhibitor for the treatment of HIV infection. *Clin Ther* 26, 352-378.
- Gallo, R. C., Sarin, P. S., Gelmann, E. P., Robert-Guroff, M., Richardson, E., Kalyanaraman, V. S., Mann, D., Sidhu, G. D., Stahl, R. E., Zolla-Pazner, S., et al. (1983). Isolation of human T-cell leukemia virus in acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* 220, 865-867.
- Gamberg, J., Barrett, L., Bowmer, M. I., Howley, C., et Grant, M. (2004). Factors related to loss of HIV-specific cytotoxic T lymphocyte activity. *AIDS* 18, 597-604.
- Ganser-Pornillos, B., Yeager, M., et Sundquist, W. I. (2008). The Structural Biology of HIV Assembly. *Curr Opin Struct Biol* 18, 203.
- Gao, X., Nelson, G. W., Karacki, P., Martin, M. P., Phair, J., Kaslow, R., Goedert, J. J., Buchbinder, S., Hoots, K., Vlahov, D., et al. (2001). Effect of a single amino acid change in MHC class I molecules on the rate of progression to AIDS. *N. Engl. J. Med* 344, 1668-1675.

- Garcia, J. V., et Miller, A. D. (1991). Serine phosphorylation-independent downregulation of cell-surface CD4 by nef. *Nature* 350, 508-511.
- Geldmacher, C., Metzler, I. S., Tovanabutra, S., Asher, T. E., Gostick, E., Ambrozak, D. R., Petrovas, C., Schuetz, A., Ngwenyama, N., Kijak, G., et al. (2009). Minor viral and host genetic polymorphisms can dramatically impact the biologic outcome of an epitope-specific CD8 T-cell response. *Blood* 114, 1553-1562.
- Gheysen, D., Jacobs, E., de Foresta, F., Thiriart, C., Francotte, M., Thines, D., et De Wilde, M. (1989). Assembly and release of HIV-1 precursor Pr55gag virus-like particles from recombinant baculovirus-infected insect cells. *Cell* 59, 103-112.
- Goepfert, P. A., Bansal, A., Edwards, B. H., Ritter, G. D., Tellez, I., McPherson, S. A., Sabbaj, S., et Mulligan, M. J. (2000). A Significant Number of Human Immunodeficiency Virus Epitope-Specific Cytotoxic T Lymphocytes Detected by Tetramer Binding Do Not Produce Gamma Interferon. *J. Virol.* 74, 10249-10255.
- Goff, S. P. (2001). Intracellular trafficking of retroviral genomes during the early phase of infection: viral exploitation of cellular pathways. *J Gene Med* 3, 517-528.
- Goh, W. C., Manel, N., et Emerman, M. (2004). The human immunodeficiency virus Vpr protein binds Cdc25C: implications for G2 arrest. *Virology* 318, 337-349.
- Goodenow, M. M., et Collman, R. G. (2006). HIV-1 coreceptor preference is distinct from target cell tropism: a dual-parameter nomenclature to define viral phenotypes. *J Leukoc Biol* 80, 965-972.
- Gottlieb, G. S., Sow, P. S., Hawes, S. E., Ndoye, I., Redman, M., Coll-Seck, A. M., Faye-Niang, M. A., Diop, A., Kuypers, J. M., Critchlow, C. W., et al. (2002). Equal plasma viral loads predict a similar rate of CD4+ T cell decline in human immunodeficiency virus (HIV) type 1- and HIV-2-infected individuals from Senegal, West Africa. *J. Infect. Dis* 185, 905-914.
- Gougeon, M. (2003). Apoptosis as an HIV strategy to escape immune attack. *Nat. Rev. Immunol* 3, 392-404.
- Grabar, S., Selinger-Leneman, H., Abgrall, S., Pialoux, G., Weiss, L., et Costagliola, D. (2009). Prevalence and comparative characteristics of long-term nonprogressors and HIV controller patients in the French Hospital Database on HIV. *AIDS* 23, 1163-1169.
- Grossman, Z., Meier-Schellersheim, M., Sousa, A. E., Victorino, R. M. M., et Paul, W. E. (2002). CD4+ T-cell depletion in HIV infection: are we closer to understanding the cause? *Nat. Med* 8, 319-323.

- Guadalupe, M., Sankaran, S., George, M. D., Reay, E., Verhoeven, D., Shacklett, B. L., Flamm, J., Wegelin, J., Prindiville, T., et Dandekar, S. (2006). Viral suppression and immune restoration in the gastrointestinal mucosa of human immunodeficiency virus type 1-infected patients initiating therapy during primary or chronic infection. *J. Virol* *80*, 8236-8247.
- Haase, A. T. (2010). Targeting early infection to prevent HIV-1 mucosal transmission. *Nature* *464*, 217-223.
- Hardy, W. D., Geering, G., Old, L. J., DE Harven, E., Brody, R. S., et McDonough, S. (1969). Feline leukemia virus: occurrence of viral antigen in the tissues of cats with lymphosarcoma and other diseases. *Science* *166*, 1019-1021.
- Harrer, E., Harrer, T., Barbosa, P., Feinberg, M., Johnson, R. P., Buchbinder, S., et Walker, B. D. (1996). Recognition of the highly conserved YMDD region in the human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase by HLA-A2-restricted cytotoxic T lymphocytes from an asymptomatic long-term nonprogressor. *J. Infect. Dis* *173*, 476-479.
- Harrison, L., Castro, H., Cane, P., Pillay, D., Booth, C., Phillips, A., Geretti, A. M., et Dunn, D. (2010). The effect of transmitted HIV-1 drug resistance on pre-therapy viral load. *AIDS* *24*, 1917-1922.
- Heinzinger, N. K., Bukinsky, M. I., Haggerty, S. A., Ragland, A. M., Kewalramani, V., Lee, M. A., Gendelman, H. E., Ratner, L., Stevenson, M., et Emerman, M. (1994). The Vpr protein of human immunodeficiency virus type 1 influences nuclear localization of viral nucleic acids in nondividing host cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* *91*, 7311-7315.
- Hengge, U. R., Goos, M., Esser, S., Exner, V., Dötterer, H., Wiehler, H., Borchard, C., Müller, K., Beckmann, A., Eppner, M. T., et al. (1998). Randomized, controlled phase II trial of subcutaneous interleukin-2 in combination with highly active antiretroviral therapy (HAART) in HIV patients. *AIDS* *12*, F225-234.
- Hetzer, C., Dormeyer, W., Schnölzer, M., et Ott, M. (2005). Decoding Tat: the biology of HIV Tat posttranslational modifications. *Microbes Infect* *7*, 1364-1369.
- Hladik, F., et McElrath, M. J. (2008). Setting the stage: host invasion by HIV. *Nat. Rev. Immunol* *8*, 447-457.
- Hsu, M., Inouye, P., Rezende, L., Richard, N., Li, Z., Prasad, V. R., et Wainberg, M. A. (1997). Higher fidelity of RNA-dependent DNA mispair extension by M184V drug-resistant than wild-type reverse transcriptase of human immunodeficiency virus type 1. *Nucleic Acids Res* *25*, 4532-4536.
- Huber, M., et Trkola, A. (2007). Humoral immunity to HIV-1: neutralization and beyond. *J. Intern. Med* *262*, 5-25.

- Huntington, N. D., Legrand, N., Alves, N. L., Jaron, B., Weijer, K., Plet, A., Corcuff, E., Mortier, E., Jacques, Y., Spits, H., et al. (2009). IL-15 trans-presentation promotes human NK cell development and differentiation in vivo. *J Exp Med* 206, 25-34.
- Huseby, D., Barklis, R. L., Alfadhli, A., et Barklis, E. (2005). Assembly of Human Immunodeficiency Virus Precursor Gag Proteins. *Journal of Biological Chemistry* 280, 17664 -17670.
- Inouye, P., Cherry, E., Hsu, M., Zolla-Pazner, S., et Wainberg, M. A. (1998). Neutralizing antibodies directed against the V3 loop select for different escape variants in a virus with mutated reverse transcriptase (M184V) than in wild-type human immunodeficiency virus type 1. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 14, 735-740.
- Jacotot, E., Ravagnan, L., Loeffler, M., Ferri, K. F., Vieira, H. L., Zamzami, N., Costantini, P., Druillennec, S., Hoebeke, J., Briand, J. P., et al. (2000). The HIV-1 viral protein R induces apoptosis via a direct effect on the mitochondrial permeability transition pore. *J. Exp. Med* 191, 33-46.
- Jeang, K. T., Xiao, H., et Rich, E. A. (1999). Multifaceted activities of the HIV-1 transactivator of transcription, Tat. *J. Biol. Chem* 274, 28837-28840.
- Jiang, W., Lederman, M. M., Hunt, P., Sieg, S. F., Haley, K., Rodriguez, B., Landay, A., Martin, J., Sinclair, E., Asher, A. I., et al. (2009). Plasma levels of bacterial DNA correlate with immune activation and the magnitude of immune restoration in persons with antiretroviral-treated HIV infection. *J. Infect. Dis* 199, 1177-1185.
- Jin, X., Bauer, D. E., Tuttleton, S. E., Lewin, S., Gettie, A., Blanchard, J., Irwin, C. E., Safrit, J. T., Mittler, J., Weinberger, L., et al. (1999). Dramatic rise in plasma viremia after CD8(+) T cell depletion in simian immunodeficiency virus-infected macaques. *J. Exp. Med* 189, 991-998.
- Juffroy, O., Bugault, F., Lambotte, O., Landires, I., Viard, J., Niel, L., Fontanet, A., Delfraissy, J., Thèze, J., et Chakrabarti, L. A. (2010). Dual mechanism of impairment of interleukin-7 (IL-7) responses in human immunodeficiency virus infection: decreased IL-7 binding and abnormal activation of the JAK/STAT5 pathway. *J. Virol* 84, 96-108.
- Kalams, S. A., Goulder, P. J., Shea, A. K., Jones, N. G., Trocha, A. K., Ogg, G. S., et Walker, B. D. (1999). Levels of human immunodeficiency virus type 1-specific cytotoxic T-lymphocyte effector and memory responses decline after suppression of viremia with highly active antiretroviral therapy. *J. Virol* 73, 6721-6728.
- Kanegane, H., et Tosato, G. (1996). Activation of naive and memory T cells by interleukin-15. *Blood* 88, 230-235.

- Karlsson, A. C., Deeks, S. G., Barbour, J. D., Heiken, B. D., Younger, S. R., Hoh, R., Lane, M., Sällberg, M., Ortiz, G. M., Demarest, J. F., et al. (2003). Dual pressure from antiretroviral therapy and cell-mediated immune response on the human immunodeficiency virus type 1 protease gene. *J. Virol* *77*, 6743-6752.
- Katlama, C., Carcelain, G., Duvivier, C., Chouquet, C., Tubiana, R., De Sa, M., Zagury, L., Calvez, V., Autran, B., et Costagliola, D. (2002). Interleukin-2 accelerates CD4 cell reconstitution in HIV-infected patients with severe immunosuppression despite highly active antiretroviral therapy: the ILSTIM study--ANRS 082. *AIDS* *16*, 2027-2034.
- Kelley, C. F., Kitchen, C. M. R., Hunt, P. W., Rodriguez, B., Hecht, F. M., Kitahata, M., Crane, H. M., Willig, J., Mugavero, M., Saag, M., et al. (2009). Incomplete peripheral CD4+ cell count restoration in HIV-infected patients receiving long-term antiretroviral treatment. *Clin. Infect. Dis* *48*, 787-794.
- Kennedy, M. K., Glaccum, M., Brown, S. N., Butz, E. A., Viney, J. L., Embers, M., Matsuki, N., Charrier, K., Sedger, L., Willis, C. R., et al. (2000). Reversible defects in natural killer and memory CD8 T cell lineages in interleukin 15-deficient mice. *J. Exp. Med* *191*, 771-780.
- Kestler, H. W., Ringler, D. J., Mori, K., Panicali, D. L., Sehgal, P. K., Daniel, M. D., et Desrosiers, R. C. (1991). Importance of the nef gene for maintenance of high virus loads and for development of AIDS. *Cell* *65*, 651-662.
- Kiepiela, P., Leslie, A. J., Honeyborne, I., Ramduth, D., Thobakgale, C., Chetty, S., Rathnavalu, P., Moore, C., Pfafferott, K. J., Hilton, L., et al. (2004). Dominant influence of HLA-B in mediating the potential co-evolution of HIV and HLA. *Nature* *432*, 769-775.
- Kiepiela, P., Ngumbela, K., Thobakgale, C., Ramduth, D., Honeyborne, I., Moodley, E., Reddy, S., de Pierres, C., Mncube, Z., Mkhwanazi, N., et al. (2007). CD8+ T-cell responses to different HIV proteins have discordant associations with viral load. *Nat. Med* *13*, 46-53.
- Kilareski, E. M., Shah, S., Nonnemacher, M. R., et Wigdahl, B. (2009). Regulation of HIV-1 transcription in cells of the monocyte-macrophage lineage. *Retrovirology* *6*, 118.
- Kilby, J. M., Hopkins, S., Venetta, T. M., DiMassimo, B., Cloud, G. A., Lee, J. Y., Alldredge, L., Hunter, E., Lambert, D., Bolognesi, D., et al. (1998). Potent suppression of HIV-1 replication in humans by T-20, a peptide inhibitor of gp41-mediated virus entry. *Nat. Med* *4*, 1302-1307.
- Koesters, S. A., Alimonti, J. B., Wachihi, C., Matu, L., Anzala, O., Kimani, J., Embree, J. E., Plummer, F. A., et Fowke, K. R. (2006). IL-7 α expression on CD4+ T lymphocytes decreases with HIV disease progression and inversely correlates with immune activation. *Eur. J. Immunol* *36*, 336-344.

- Kostense, S., Ogg, G., Manting, E., Gillespie, G., Joling, J., Vandenberghe, K., Veenhof, E. Z., Baarle, D., Jurriaans, S., Klein, M., et al. (2001). High viral burden in the presence of major HIV-specific CD8⁺ T cell expansions: evidence for impaired CTL effector function. *European Journal of Immunology* 31, 677-686.
- Koup, R. A., Safrit, J. T., Cao, Y., Andrews, C. A., McLeod, G., Borkowsky, W., Farthing, C., et Ho, D. D. (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.
- Kovacs, J. A., Baseler, M., Dewar, R. J., Vogel, S., Davey, R. T., Falloon, J., Polis, M. A., Walker, R. E., Stevens, R., et Salzman, N. P. (1995). Increases in CD4 T lymphocytes with intermittent courses of interleukin-2 in patients with human immunodeficiency virus infection. A preliminary study. *N. Engl. J. Med* 332, 567-575.
- Kovacs, J. A., Vogel, S., Albert, J. M., Falloon, J., Davey, R. T., Walker, R. E., Polis, M. A., Spooner, K., Metcalf, J. A., Baseler, M., et al. (1996). Controlled trial of interleukin-2 infusions in patients infected with the human immunodeficiency virus. *N. Engl. J. Med* 335, 1350-1356.
- Kuritzkes, D. R., Quinn, J. B., Benoit, S. L., Shugarts, D. L., Griffin, A., Bakhtiari, M., Poticha, D., Eron, J. J., Fallon, M. A., et Rubin, M. (1996). Drug resistance and virologic response in NUCA 3001, a randomized trial of lamivudine (3TC) versus zidovudine (ZDV) versus ZDV plus 3TC in previously untreated patients. *AIDS* 10, 975-981.
- Le Rouzic, E., Mousnier, A., Rustum, C., Stutz, F., Hallberg, E., Dargemont, C., et Benichou, S. (2002). Docking of HIV-1 Vpr to the nuclear envelope is mediated by the interaction with the nucleoporin hCG1. *J. Biol. Chem* 277, 45091-45098.
- Lee, J. K., Stewart-Jones, G., Dong, T., Harlos, K., Di Gleria, K., Dorrell, L., Douek, D. C., van der Merwe, P. A., Jones, E. Y., et McMichael, A. J. (2004). T cell cross-reactivity and conformational changes during TCR engagement. *J. Exp. Med* 200, 1455-1466.
- Leggatt, G. R., Hosmalin, A., Pendleton, C. D., Kumar, A., Hoffman, S., et Berzofsky, J. A. (1998). The importance of pairwise interactions between peptide residues in the delineation of TCR specificity. *J. Immunol* 161, 4728-4735.
- Lelièvre, J., Petit, F., Arnoult, D., Ameisen, J., et Estaquier, J. (2005). Interleukin 7 increases human immunodeficiency virus type 1 LAI-mediated Fas-induced T-cell death. *J. Virol* 79, 3195-3199.
- Levy, J. A., Hoffman, A. D., Kramer, S. M., Landis, J. A., Shimabukuro, J. M., et Oshiro, L. S. (1984). Isolation of lymphocytopathic retroviruses from San Francisco patients with AIDS. *Science* 225, 840-842.

- Levy, Y., Capitant, C., Houhou, S., Carriere, I., Viard, J. P., Goujard, C., Gastaut, J. A., Oksenhendler, E., Boumsell, L., Gomard, E., et al. (1999). Comparison of subcutaneous and intravenous interleukin-2 in asymptomatic HIV-1 infection: a randomised controlled trial. ANRS 048 study group. *Lancet* *353*, 1923-1929.
- Levy, Y., Durier, C., Krzysiek, R., Rabian, C., Capitant, C., Lascaux, A., Michon, C., Oksenhendler, E., Weiss, L., Gastaut, J., et al. (2003). Effects of interleukin-2 therapy combined with highly active antiretroviral therapy on immune restoration in HIV-1 infection: a randomized controlled trial. *AIDS* *17*, 343-351.
- Levy, Y., Lacabaratz, C., Weiss, L., Viard, J., Goujard, C., Lelièvre, J., Boué, F., Molina, J., Rouzioux, C., Avettand-Fénoël, V., et al. (2009). Enhanced T cell recovery in HIV-1-infected adults through IL-7 treatment. *J. Clin. Invest* *119*, 997-1007.
- Lin, C., Tsai, S., Lee, T., Chien, R., Liao, S., et Liaw, Y. (2005). High frequency of functional anti-YMDD and -mutant cytotoxic T lymphocytes after in vitro expansion correlates with successful response to lamivudine therapy for chronic hepatitis B. *Gut* *54*, 152-161.
- Link, A., Vogt, T. K., Favre, S., Britschgi, M. R., Acha-Orbea, H., Hinz, B., Cyster, J. G., et Luther, S. A. (2007). Fibroblastic reticular cells in lymph nodes regulate the homeostasis of naive T cells. *Nat Immunol* *8*, 1255-1265.
- Liu, J., Bartesaghi, A., Borgnia, M. J., Sapiro, G., et Subramaniam, S. (2008). Molecular architecture of native HIV-1 gp120 trimers. *Nature* *455*, 109-113.
- Llano, A., Barretina, J., Gutiérrez, A., Blanco, J., Cabrera, C., Clotet, B., et Esté, J. A. (2001). Interleukin-7 in plasma correlates with CD4 T-cell depletion and may be associated with emergence of syncytium-inducing variants in human immunodeficiency virus type 1-positive individuals. *J. Virol* *75*, 10319-10325.
- Lori, F., di Marzo Veronese, F., de Vico, A. L., Lusso, P., Reitz, M. S., et Gallo, R. C. (1992). Viral DNA carried by human immunodeficiency virus type 1 virions. *J. Virol* *66*, 5067-5074.
- Lum, J. J., Schneppe, D. J., et Badley, A. D. (2005). Acquired T-cell sensitivity to TRAIL mediated killing during HIV infection is regulated by CXCR4-gp120 interactions. *AIDS* *19*, 1125-1133.
- Maguire, M., Gartland, M., Moore, S., Hill, A., Tisdale, M., Harrigan, R., et Kleim, J. P. (2000). Absence of zidovudine resistance in antiretroviral-naive patients following zidovudine/lamivudine/protease inhibitor combination therapy: virological evaluation of the AVANTI 2 and AVANTI 3 studies. *AIDS* *14*, 1195-1201.
- Mahnke, L., et Clifford, D. (2006). Cytotoxic T cell recognition of an HIV-1 reverse transcriptase variant peptide incorporating the K103N drug resistance mutation. *AIDS Res Ther* *3*, 21.

- Malim, M. H., Hauber, J., Le, S. Y., Maizel, J. V., et Cullen, B. R. (1989). The HIV-1 rev transactivator acts through a structured target sequence to activate nuclear export of unspliced viral mRNA. *Nature* *338*, 254-257.
- Mansky, L. M. (1996). Forward mutation rate of human immunodeficiency virus type 1 in a T lymphoid cell line. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* *12*, 307-314.
- Marchand, C., Maddali, K., Métifiot, M., et Pommier, Y. (2009). HIV-1 IN inhibitors: 2010 update and perspectives. *Curr Top Med Chem* *9*, 1016-1037.
- Mariani, R., Chen, D., Schröfelbauer, B., Navarro, F., König, R., Bollman, B., Münk, C., Nymark-McMahon, H., et Landau, N. R. (2003). Species-specific exclusion of APOBEC3G from HIV-1 virions by Vif. *Cell* *114*, 21-31.
- Martinez, V., Costagliola, D., Bonduelle, O., N'go, N., Schnuriger, A., Théodorou, I., Clauvel, J., Sicard, D., Agut, H., Debré, P., et al. (2005). Combination of HIV-1-specific CD4 Th1 cell responses and IgG2 antibodies is the best predictor for persistence of long-term nonprogression. *J. Infect. Dis* *191*, 2053-2063.
- Martinez-Picado, J., Prado, J. G., Fry, E. E., Pfafferott, K., Leslie, A., Chetty, S., Thobakgale, C., Honeyborne, I., Crawford, H., Matthews, P., et al. (2006). Fitness cost of escape mutations in p24 Gag in association with control of human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol* *80*, 3617-3623.
- Mason, R. D., Bowmer, M. I., Howley, C. M., Gallant, M., Myers, J. C. E., et Grant, M. D. (2004). Antiretroviral drug resistance mutations sustain or enhance CTL recognition of common HIV-1 Pol epitopes. *J. Immunol* *172*, 7212-7219.
- Mattapallil, J. J., Douek, D. C., Hill, B., Nishimura, Y., Martin, M., et Roederer, M. (2005). Massive infection and loss of memory CD4+ T cells in multiple tissues during acute SIV infection. *Nature* *434*, 1093-1097.
- Mavigner, M., Delobel, P., Cazabat, M., Dubois, M., L'faqihi-Olive, F., Raymond, S., Pasquier, C., Marchou, B., Massip, P., et Izopet, J. (2009). HIV-1 residual viremia correlates with persistent T-cell activation in poor immunological responders to combination antiretroviral therapy. *PLoS ONE* *4*, e7658.
- McCutchan, F. E. (2000). Understanding the genetic diversity of HIV-1. *AIDS* *14 Suppl 3*, S31-44.
- McDonald, D., Wu, L., Bohks, S. M., KewalRamani, V. N., Unutmaz, D., et Hope, T. J. (2003). Recruitment of HIV and its receptors to dendritic cell-T cell junctions. *Science* *300*, 1295-1297.
- Mehandru, S., Poles, M. A., Tenner-Racz, K., Jean-Pierre, P., Manuelli, V., Lopez, P., Shet, A., Low, A., Mohri, H., Boden, D., et al. (2006). Lack of mucosal immune reconstitution during prolonged treatment of acute and early HIV-1 infection. *PLoS Med* *3*, e484.

- Mercier, F., Boulassel, M., Yassine-Diab, B., Tremblay, C., Bernard, N., Sekaly, R., et Routy, J. (2008). Persistent human immunodeficiency virus-1 antigenaemia affects the expression of interleukin-7R α on central and effector memory CD4 $^{+}$ and CD8 $^{+}$ T cell subsets. *Clin. Exp. Immunol* 152, 72-80.
- Mildvan, D., Mathur, U., Enlow, R. W., Romain, P. L., Winchester, R. J., Colp, C., Singman, H., Adelsberg, B. R., et Spigland, I. (1982). Opportunistic infections and immune deficiency in homosexual men. *Ann. Intern. Med* 96, 700-704.
- Milicic, A., Price, D. A., Zimbwa, P., Booth, B. L., Brown, H. L., Easterbrook, P. J., Olsen, K., Robinson, N., Gileadi, U., Sewell, A. K., et al. (2005). CD8 $^{+}$ T cell epitope-flanking mutations disrupt proteasomal processing of HIV-1 Nef. *J. Immunol* 175, 4618-4626.
- Miller, V., Stark, T., Loeliger, A. E., et Lange, J. M. A. (2002). The impact of the M184V substitution in HIV-1 reverse transcriptase on treatment response. *HIV Medicine* 3, 135-145.
- Mitra, D., Steiner, M., Lynch, D. H., Staiano-Coico, L., et Laurence, J. (1996). HIV-1 upregulates Fas ligand expression in CD4 $^{+}$ T cells in vitro and in vivo: association with Fas-mediated apoptosis and modulation by aurointricarboxylic acid. *Immunology* 87, 581-585.
- Molla, A., Korneyeva, M., Gao, Q., Vasavanonda, S., Schipper, P. J., Mo, H. M., Markowitz, M., Chernyavskiy, T., Niu, P., Lyons, N., et al. (1996). Ordered accumulation of mutations in HIV protease confers resistance to ritonavir. *Nat. Med* 2, 760-766.
- Moore, R. D., Gebo, K. A., Lucas, G. M., et Keruly, J. C. (2008). Rate of comorbidities not related to HIV infection or AIDS among HIV-infected patients, by CD4 cell count and HAART use status. *Clin. Infect. Dis* 47, 1102-1104.
- Mortier, E., Quémener, A., Vusio, P., Lorenzen, I., Boublik, Y., Grötzinger, J., Plet, A., et Jacques, Y. (2006). Soluble interleukin-15 receptor alpha (IL-15R α)-sushi as a selective and potent agonist of IL-15 action through IL-15R beta/gamma. Hyperagonist IL-15 x IL-15R α fusion proteins. *J. Biol. Chem* 281, 1612-1619.
- Mrózek, E., Anderson, P., et Caligiuri, M. A. (1996). Role of interleukin-15 in the development of human CD56 $^{+}$ natural killer cells from CD34 $^{+}$ hematopoietic progenitor cells. *Blood* 87, 2632-2640.
- Mueller, S. M., Schaetz, B., Eismann, K., Bergmann, S., Bauerle, M., Schmitt-Haendle, M., Walter, H., Schmidt, B., Korn, K., Sticht, H., et al. (2007). Dual selection pressure by drugs and HLA class I-restricted immune responses on human immunodeficiency virus type 1 protease. *J. Virol* 81, 2887-2898.

- Mueller, Y. M., Bojczuk, P. M., Halstead, E. S., Kim, A. H. J., Witek, J., Altman, J. D., et Katsikis, P. D. (2003). IL-15 enhances survival and function of HIV-specific CD8+ T cells. *Blood* *101*, 1024-1029.
- Mueller, Y. M., Do, D. H., Altork, S. R., Artlett, C. M., Gracely, E. J., Katsetos, C. D., Legido, A., Villinger, F., Altman, J. D., Brown, C. R., et al. (2008). IL-15 treatment during acute simian immunodeficiency virus (SIV) infection increases viral set point and accelerates disease progression despite the induction of stronger SIV-specific CD8+ T cell responses. *J. Immunol* *180*, 350-360.
- Mueller, Y. M., Makar, V., Bojczuk, P. M., Witek, J., et Katsikis, P. D. (2003). IL-15 enhances the function and inhibits CD95/Fas-induced apoptosis of human CD4+ and CD8+ effector-memory T cells. *Int. Immunol* *15*, 49-58.
- Mueller, Y. M., Petrovas, C., Bojczuk, P. M., Dimitriou, I. D., Beer, B., Silvera, P., Villinger, F., Cairns, J. S., Gracely, E. J., Lewis, M. G., et al. (2005). Interleukin-15 increases effector memory CD8+ t cells and NK Cells in simian immunodeficiency virus-infected macaques. *J. Virol* *79*, 4877-4885.
- Muster, T., Steindl, F., Purtscher, M., Trkola, A., Klima, A., Himmler, G., Rucker, F., et Katinger, H. (1993). A conserved neutralizing epitope on gp41 of human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol* *67*, 6642-6647.
- Muthumani, K., Hwang, D. S., Choo, A. Y., Mayilvahanan, S., Dayes, N. S., Thieu, K. P., et Weiner, D. B. (2005). HIV-1 Vpr inhibits the maturation and activation of macrophages and dendritic cells in vitro. *Int. Immunol* *17*, 103-116.
- Naeger, L. K., Margot, N. A., et Miller, M. D. (2002). ATP-dependent removal of nucleoside reverse transcriptase inhibitors by human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase. *Antimicrob. Agents Chemother* *46*, 2179-2184.
- Naora, H., et Gougeon, M. L. (1999). Interleukin-15 is a potent survival factor in the prevention of spontaneous but not CD95-induced apoptosis in CD4 and CD8 T lymphocytes of HIV-infected individuals. Correlation with its ability to increase BCL-2 expression. *Cell Death Differ* *6*, 1002-1011.
- Napolitano, L. A., Grant, R. M., Deeks, S. G., Schmidt, D., De Rosa, S. C., Herzenberg, L. A., Herndier, B. G., Andersson, J., et McCune, J. M. (2001). Increased production of IL-7 accompanies HIV-1-mediated T-cell depletion: implications for T-cell homeostasis. *Nat. Med* *7*, 73-79.
- Negrini, M., et Buc, H. (2001). Mechanisms of retroviral recombination. *Annu. Rev. Genet* *35*, 275-302.
- Neil, S. J. D., Zang, T., et Bieniasz, P. D. (2008). Tetherin inhibits retrovirus release and is antagonized by HIV-1 Vpu. *Nature* *451*, 425-430.

- Nitahara-Kasahara, Y., Kamata, M., Yamamoto, T., Zhang, X., Miyamoto, Y., Muneta, K., Iijima, S., Yoneda, Y., Tsunetsugu-Yokota, Y., et Aida, Y. (2007). Novel nuclear import of Vpr promoted by importin alpha is crucial for human immunodeficiency virus type 1 replication in macrophages. *J. Virol* *81*, 5284-5293.
- Nugeyre, M., Monceaux, V., Beq, S., Cumont, M., Ho Tsong Fang, R., Chêne, L., Morre, M., Barré-Sinoussi, F., Hurtrel, B., et Israël, N. (2003). IL-7 stimulates T cell renewal without increasing viral replication in simian immunodeficiency virus-infected macaques. *J. Immunol* *171*, 4447-4453.
- Ofek, G., Tang, M., Sambor, A., Katinger, H., Mascola, J. R., Wyatt, R., et Kwong, P. D. (2004). Structure and mechanistic analysis of the anti-human immunodeficiency virus type 1 antibody 2F5 in complex with its gp41 epitope. *J. Virol* *78*, 10724-10737.
- Ogg, G. S., Jin, X., Bonhoeffer, S., Moss, P., Nowak, M. A., Monard, S., Segal, J. P., Cao, Y., Rowland-Jones, S. L., Hurley, A., et al. (1999). Decay kinetics of human immunodeficiency virus-specific effector cytotoxic T lymphocytes after combination antiretroviral therapy. *J. Virol* *73*, 797-800.
- Okazaki, T., Terabe, M., Catanzaro, A. T., Pendleton, C. D., Yarchoan, R., et Berzofsky, J. A. (2006). Possible therapeutic vaccine strategy against human immunodeficiency virus escape from reverse transcriptase inhibitors studied in HLA-A2 transgenic mice. *J. Virol* *80*, 10645-10651.
- Ono, A., et Freed, E. O. (2001). Plasma membrane rafts play a critical role in HIV-1 assembly and release. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *98*, 13925 -13930.
- Osborne, L. C., et Abraham, N. (2010). Regulation of memory T cells by gamma-cytokines. *Cytokine* *50*, 105-113.
- Ostroukhova, M., Qi, Z., Oriss, T. B., Dixon-McCarthy, B., Ray, P., et Ray, A. (2006). Treg-mediated immunosuppression involves activation of the Notch-HES1 axis by membrane-bound TGF-beta. *J. Clin. Invest* *116*, 996-1004.
- Ostrowski, S. R., Katzenstein, T. L., Thim, P. T., Pedersen, B. K., Gerstoft, J., et Ullum, H. (2005). Low-level viremia and proviral DNA impede immune reconstitution in HIV-1-infected patients receiving highly active antiretroviral therapy. *J. Infect. Dis* *191*, 348-357.
- Paiardini, M., Pandrea, I., Apetrei, C., et Silvestri, G. (2009). Lessons Learned from the Natural Hosts of HIV-Related Viruses. *Annu. Rev. Med.* *60*, 485-495.
- Pandey, R. C., Datta, D., Mukerjee, R., Srinivasan, A., Mahalingam, S., et Sawaya, B. E. (2009). HIV-1 Vpr: a closer look at the multifunctional protein from the structural perspective. *Curr. HIV Res* *7*, 114-128.

- Panos, G., et Nelson, M. (2008). Viral (HIV) Entry: How Does It Work? Dans *Entry Inhibiteurs*, p. 3-10. Available at: http://dx.doi.org/10.1007/978-3-540-78358-9_1 [Accédé Juillet 20, 2010].
- Patterson, J., Jesser, R., et Weinberg, A. (2008). Distinctive in vitro effects of T-cell growth cytokines on cytomegalovirus-stimulated T-cell responses of HIV-infected HAART recipients. *Virology* 378, 48-57.
- Pellegrin, I., Legrand, E., Neau, D., Bonot, P., Masquelier, B., Pellegrin, J. L., Ragnaud, J. M., Bernard, N., et Fleury, H. J. (1996). Kinetics of appearance of neutralizing antibodies in 12 patients with primary or recent HIV-1 infection and relationship with plasma and cellular viral loads. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr. Hum. Retrovirol* 11, 438-447.
- Perez-Caballero, D., Zang, T., Ebrahimi, A., McNatt, M. W., Gregory, D. A., Johnson, M. C., et Bieniasz, P. D. (2009). Tetherin inhibits HIV-1 release by directly tethering virions to cells. *Cell* 139, 499-511.
- Perrin, L. (1999). Primary HIV infection. *Antivir. Ther. (Lond.)* 4 Suppl 3, 13-18.
- Peterlin, B. M., et Trono, D. (2003). Hide, shield and strike back: how HIV-infected cells avoid immune eradication. *Nat Rev Immunol* 3, 97-107.
- Petrella, M., et Wainberg, M. A. (2002). Might the M184V substitution in HIV-1 RT confer clinical benefit? *AIDS Rev* 4, 224-232.
- Pettit, S. C., Everitt, L. E., Choudhury, S., Dunn, B. M., et Kaplan, A. H. (2004). Initial cleavage of the human immunodeficiency virus type 1 GagPol precursor by its activated protease occurs by an intramolecular mechanism. *J. Virol* 78, 8477-8485.
- Picker, L. J., Reed-Inderbitzin, E. F., Hagen, S. I., Edgar, J. B., Hansen, S. G., Legasse, A., Planer, S., Piatak, M., Lifson, J. D., Maino, V. C., et al. (2006). IL-15 induces CD4 effector memory T cell production and tissue emigration in nonhuman primates. *J. Clin. Invest* 116, 1514-1524.
- Piketty, C., Castiel, P., Belec, L., Batisse, D., Si Mohamed, A., Gilquin, J., Gonzalez-Canali, G., Jayle, D., Karmochkine, M., Weiss, L., et al. (1998). Discrepant responses to triple combination antiretroviral therapy in advanced HIV disease. *AIDS* 12, 745-750.
- Pilgrim, A. K., Pantaleo, G., Cohen, O. J., Fink, L. M., Zhou, J. Y., Zhou, J. T., Bolognesi, D. P., Fauci, A. S., et Montefiori, D. C. (1997). Neutralizing antibody responses to human immunodeficiency virus type 1 in primary infection and long-term-nonprogressive infection. *J. Infect. Dis* 176, 924-932.
- Plantier, J., Leoz, M., Dickerson, J. E., De Oliveira, F., Cordonnier, F., Lemée, V., Damond, F., Robertson, D. L., et Simon, F. (2009). A new human immunodeficiency virus derived from gorillas. *Nat. Med* 15, 871-872.

- Poonia, B., Pauza, C. D., et Salvato, M. S. (2009). Role of the Fas/FasL pathway in HIV or SIV disease. *Retrovirology* 6, 91.
- Pumfery, A., Deng, L., Maddukuri, A., de la Fuente, C., Li, H., Wade, J. D., Lambert, P., Kumar, A., et Kashanchi, F. (2003). Chromatin remodeling and modification during HIV-1 Tat-activated transcription. *Curr. HIV Res* 1, 343-362.
- Purcell, D. F., et Martin, M. A. (1993). Alternative splicing of human immunodeficiency virus type 1 mRNA modulates viral protein expression, replication, and infectivity. *J. Virol* 67, 6365-6378.
- Purtscher, M., Trkola, A., Gruber, G., Buchacher, A., Predl, R., Steindl, F., Tauer, C., Berger, R., Barrett, N., et Jungbauer, A. (1994). A broadly neutralizing human monoclonal antibody against gp41 of human immunodeficiency virus type 1. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 10, 1651-1658.
- Quagliarello, V. (1982). The Acquired Immunodeficiency Syndrome: current status. *Yale J Biol Med* 55, 443-452.
- Quivy, V., De Walque, S., et Van Lint, C. (2007). Chromatin-associated regulation of HIV-1 transcription: implications for the development of therapeutic strategies. *Subcell. Biochem* 41, 371-396.
- Rana, T. M., et Jeang, K. T. (1999). Biochemical and functional interactions between HIV-1 Tat protein and TAR RNA. *Arch. Biochem. Biophys* 365, 175-185.
- Rehr, M., Cahenzli, J., Haas, A., Price, D. A., Gostick, E., Huber, M., Karrer, U., et Oxenius, A. (2008). Emergence of polyfunctional CD8+ T cells after prolonged suppression of human immunodeficiency virus replication by antiretroviral therapy. *J. Virol* 82, 3391-3404.
- Rethi, B., Fluor, C., Atlas, A., Krzyzowska, M., Mowafi, F., Grützmeier, S., De Milito, A., Bellocco, R., Falk, K. I., Rajnavölgyi, E., et al. (2005). Loss of IL-7R α is associated with CD4 T-cell depletion, high interleukin-7 levels and CD28 down-regulation in HIV infected patients. *AIDS* 19, 2077-2086.
- Riddler, S. A., Haubrich, R., DiRienzo, A. G., Peeples, L., Powderly, W. G., Klingman, K. L., Garren, K. W., George, T., Rooney, J. F., Brizz, B., et al. (2008). Class-sparing regimens for initial treatment of HIV-1 infection. *N. Engl. J. Med* 358, 2095-2106.
- Roberts, J., Bebenek, K., et Kunkel, T. (1988). The accuracy of reverse transcriptase from HIV-1. *Science* 242, 1171-1173.
- Rochman, Y., Spolski, R., et Leonard, W. J. (2009). New insights into the regulation of T cells by [gamma]c family cytokines. *Nat Rev Immunol* 9, 480-490.

- Romani, B., Engelbrecht, S., et Glashoff, R. H. (2010). Functions of Tat: the versatile protein of human immunodeficiency virus type 1. *J. Gen. Virol* *91*, 1-12.
- Rook, A. H., Masur, H., Lane, H. C., Frederick, W., Kasahara, T., Macher, A. M., Djeu, J. Y., Manischewitz, J. F., Jackson, L., Fauci, A. S., et al. (1983). Interleukin-2 enhances the depressed natural killer and cytomegalovirus-specific cytotoxic activities of lymphocytes from patients with the acquired immune deficiency syndrome. *J. Clin. Invest* *72*, 398-403.
- Roques, P., Robertson, D. L., Souquière, S., Apetrei, C., Nerrienet, E., Barré-Sinoussi, F., Müller-Trutwin, M., et Simon, F. (2004). Phylogenetic characteristics of three new HIV-1 N strains and implications for the origin of group N. *AIDS* *18*, 1371-1381.
- Sacha, J. B., Chung, C., Rakasz, E. G., Spencer, S. P., Jonas, A. K., Bean, A. T., Lee, W., Burwitz, B. J., Stephany, J. J., Loffredo, J. T., et al. (2007). Gag-specific CD8⁺ T lymphocytes recognize infected cells before AIDS-virus integration and viral protein expression. *J. Immunol* *178*, 2746-2754.
- Salghetti, S., Mariani, R., et Skowronski, J. (1995). Human immunodeficiency virus type 1 Nef and p56lck protein-tyrosine kinase interact with a common element in CD4 cytoplasmic tail. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* *92*, 349-353.
- Sallusto, F., Geginat, J., et Lanzavecchia, A. (2004). Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance. *Annu. Rev. Immunol* *22*, 745-763.
- Samri, A., Haas, G., Duntze, J., Bouley, J. M., Calvez, V., Katlama, C., et Autran, B. (2000). Immunogenicity of mutations induced by nucleoside reverse transcriptase inhibitors for human immunodeficiency virus type 1-specific cytotoxic T cells. *J. Virol* *74*, 9306-9312.
- Scherer, A., Frater, J., Oxenius, A., Agudelo, J., Price, D. A., Günthard, H. F., Barnardo, M., Perrin, L., Hirschel, B., Phillips, R. E., et al. (2004). Quantifiable cytotoxic T lymphocyte responses and HLA-related risk of progression to AIDS. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* *101*, 12266-12270.
- Schindler, M., Würfl, S., Benaroch, P., Greenough, T. C., Daniels, R., Easterbrook, P., Brenner, M., Münch, J., et Kirchhoff, F. (2003). Down-modulation of mature major histocompatibility complex class II and up-regulation of invariant chain cell surface expression are well-conserved functions of human and simian immunodeficiency virus nef alleles. *J. Virol* *77*, 10548-10556.
- Schmitt, M., Harrer, E., Goldwisch, A., Bäuerle, M., Graedner, I., Kalden, J. R., et Harrer, T. (2000). Specific recognition of lamivudine-resistant HIV-1 by cytotoxic T lymphocytes. *AIDS* *14*, 653-658.

- Schmitt-Haendle, M., Bachmann, O., Harrer, E., Schmidt, B., Bäuerle, M., et Harrer, T. (2005). Recognition patterns of HLA-A2-restricted human immunodeficiency virus-1-specific cytotoxic T-lymphocytes in a cohort of HIV-1-infected individuals. *Viral Immunol* *18*, 627-636.
- Schneidewind, A., Brockman, M. A., Yang, R., Adam, R. I., Li, B., Le Gall, S., Rinaldo, C. R., Craggs, S. L., Allgaier, R. L., Power, K. A., et al. (2007). Escape from the dominant HLA-B27-restricted cytotoxic T-lymphocyte response in Gag is associated with a dramatic reduction in human immunodeficiency virus type 1 replication. *J. Virol* *81*, 12382-12393.
- Schuurman, R., Nijhuis, M., van Leeuwen, R., Schipper, P., de Jong, D., Collis, P., Danner, S. A., Mulder, J., Loveday, C., et Christopherson, C. (1995). Rapid changes in human immunodeficiency virus type 1 RNA load and appearance of drug-resistant virus populations in persons treated with lamivudine (3TC). *J. Infect. Dis* *171*, 1411-1419.
- Schwartz, O., Maréchal, V., Le Gall, S., Lemonnier, F., et Heard, J. M. (1996). Endocytosis of major histocompatibility complex class I molecules is induced by the HIV-1 Nef protein. *Nat. Med* *2*, 338-342.
- Seki, Y., Yang, J., Okamoto, M., Tanaka, S., Goitsuka, R., Farrar, M. A., et Kubo, M. (2007). IL-7/STAT5 cytokine signaling pathway is essential but insufficient for maintenance of naive CD4 T cell survival in peripheral lymphoid organs. *J. Immunol* *178*, 262-270.
- Sereti, I., Dunham, R. M., Spritzler, J., Aga, E., Proschan, M. A., Medvik, K., Battaglia, C. A., Landay, A. L., Pahwa, S., Fischl, M. A., et al. (2009). IL-7 administration drives T cell-cycle entry and expansion in HIV-1 infection. *Blood* *113*, 6304-6314.
- Shankar, P., Russo, M., Harnisch, B., Patterson, M., Skolnik, P., et Lieberman, J. (2000). Impaired function of circulating HIV-specific CD8(+) T cells in chronic human immunodeficiency virus infection. *Blood* *96*, 3094-3101.
- Sharma, P. L., et Crumpacker, C. S. (1999). Decreased processivity of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase (RT) containing didanosine-selected mutation Leu74Val: a comparative analysis of RT variants Leu74Val and lamivudine-selected Met184Val. *J. Virol* *73*, 8448-8456.
- Sharma, P. L., Nettles, J. H., Feldman, A., Rapp, K., et Schinazi, R. F. (2009). Comparative analysis of in vitro processivity of HIV-1 reverse transcriptases containing mutations 65R, 74V, 184V and 65R+74V. *Antiviral Res* *83*, 317-323.
- Simonelli, C., Zanussi, S., Sandri, S., Comar, M., Lucenti, A., Talamini, R., Bortolin, M. T., Giacca, M., De Paoli, P., et Tirelli, U. (1999). Concomitant therapy with subcutaneous interleukin-2 and zidovudine plus didanosine in patients with early stage HIV infection. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr. Hum. Retrovirol* *20*, 20-27.

- Sousa, A. E., Carneiro, J., Meier-Schellersheim, M., Grossman, Z., et Victorino, R. M. M. (2002). CD4 T cell depletion is linked directly to immune activation in the pathogenesis of HIV-1 and HIV-2 but only indirectly to the viral load. *J. Immunol* *169*, 3400-3406.
- Spiegel, H. M., DeFalcon, E., Ogg, G. S., Larsson, M., Beadle, T. J., Tao, P., McMichael, A. J., Bhardwaj, N., O'Callaghan, C., Cox, W. I., et al. (1999). Changes in frequency of HIV-1-specific cytotoxic T cell precursors and circulating effectors after combination antiretroviral therapy in children. *J. Infect. Dis* *180*, 359-368.
- Sportès, C., Hakim, F. T., Memon, S. A., Zhang, H., Chua, K. S., Brown, M. R., Fleisher, T. A., Krumlauf, M. C., Babb, R. R., Chow, C. K., et al. (2008). Administration of rhIL-7 in humans increases in vivo TCR repertoire diversity by preferential expansion of naive T cell subsets. *J. Exp. Med* *205*, 1701-1714.
- Stevenson, M. (1996). Portals of entry: uncovering HIV nuclear transport pathways. *Trends Cell Biol* *6*, 9-15.
- Stove, V., Van de Walle, I., Naessens, E., Coene, E., Stove, C., Plum, J., et Verhasselt, B. (2005). Human immunodeficiency virus Nef induces rapid internalization of the T-cell coreceptor CD8alpha. *J. Virol* *79*, 11422-11433.
- Surh, C. D., et Sprent, J. (2008). Homeostasis of naive and memory T cells. *Immunity* *29*, 848-862.
- Suzuki, Y., et Craigie, R. (2007). The road to chromatin - nuclear entry of retroviruses. *Nat. Rev. Microbiol* *5*, 187-196.
- Swigut, T., Shohdy, N., et Skowronski, J. (2001). Mechanism for down-regulation of CD28 by Nef. *EMBO J* *20*, 1593-1604.
- Swingler, S., Brichacek, B., Jacque, J., Ulich, C., Zhou, J., et Stevenson, M. (2003). HIV-1 Nef intersects the macrophage CD40L signalling pathway to promote resting-cell infection. *Nature* *424*, 213-219.
- Takehisa, J., Zekeng, L., Ido, E., Yamaguchi-Kabata, Y., Mboudjeka, I., Harada, Y., Miura, T., Kaptu, L., et Hayami, M. (1999). Human immunodeficiency virus type 1 intergroup (M/O) recombination in cameroon. *J. Virol* *73*, 6810-6820.
- Tan, J. T., Dudl, E., LeRoy, E., Murray, R., Sprent, J., Weinberg, K. I., et Surh, C. D. (2001). IL-7 is critical for homeostatic proliferation and survival of naive T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* *98*, 8732-8737.
- Teixeira, L., Valdez, H., McCune, J. M., Koup, R. A., Badley, A. D., Hellerstein, M. K., Napolitano, L. A., Douek, D. C., Mbisa, G., Deeks, S., et al. (2001). Poor CD4 T cell restoration after suppression of HIV-1 replication may reflect lower thymic function. *AIDS* *15*, 1749-1756.

- Tenzer, S., Wee, E., Burgevin, A., Stewart-Jones, G., Friis, L., Lamberth, K., Chang, C., Harndahl, M., Weimershaus, M., Gerstoft, J., et al. (2009). Antigen processing influences HIV-specific cytotoxic T lymphocyte immunodominance. *Nat. Immunol* *10*, 636-646.
- Theobald, M., Ruppert, T., Kuckelkorn, U., Hernandez, J., Häussler, A., Ferreira, E. A., Liewer, U., Biggs, J., Levine, A. J., Huber, C., et al. (1998). The sequence alteration associated with a mutational hotspot in p53 protects cells from lysis by cytotoxic T lymphocytes specific for a flanking peptide epitope. *J. Exp. Med* *188*, 1017-1028.
- Trimble, L. A., et Lieberman, J. (1998). Circulating CD8 T lymphocytes in human immunodeficiency virus-infected individuals have impaired function and downmodulate CD3 zeta, the signaling chain of the T-cell receptor complex. *Blood* *91*, 585-594.
- Turner, D., Brenner, B. G., Routy, J. P., Petrella, M., et Wainberg, M. A. (2004). Rationale for maintenance of the M184v resistance mutation in human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase in treatment experienced patients. *New Microbiol* *27*, 31-39.
- Update on acquired immune deficiency syndrome (AIDS)--United States (1982). *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep* *31*, 507-508, 513-514.
- Van Maele, B., et Debyser, Z. (2005). HIV-1 integration: an interplay between HIV-1 integrase, cellular and viral proteins. *AIDS Rev* *7*, 26-43.
- Vassena, L., Proschan, M., Fauci, A. S., et Lusso, P. (2007). Interleukin 7 reduces the levels of spontaneous apoptosis in CD4+ and CD8+ T cells from HIV-1-infected individuals. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* *104*, 2355-2360.
- Vergne, L., Bourgeois, A., Mpoudi-Ngole, E., Mougnotou, R., Mbuagbaw, J., Liegeois, F., Laurent, C., Butel, C., Zekeng, L., Delaporte, E., et al. (2003). Biological and genetic characteristics of HIV infections in Cameroon reveals dual group M and O infections and a correlation between SI-inducing phenotype of the predominant CRF02_AG variant and disease stage. *Virology* *310*, 254-266.
- Vodicka, M. A., Koepf, D. M., Silver, P. A., et Emerman, M. (1998). HIV-1 Vpr interacts with the nuclear transport pathway to promote macrophage infection. *Genes Dev* *12*, 175-185.
- Wainberg, M. A., Drosopoulos, W. C., Salomon, H., Hsu, M., Borkow, G., Parniak, M., Gu, Z., Song, Q., Manne, J., Islam, S., et al. (1996). Enhanced fidelity of 3TC-selected mutant HIV-1 reverse transcriptase. *Science* *271*, 1282-1285.
- Wain-Hobson, S., Sonigo, P., Danos, O., Cole, S., et Alizon, M. (1985). Nucleotide sequence of the AIDS virus, LAV. *Cell* *40*, 9-17.

- Waldmann, T. A. (2006). The biology of interleukin-2 and interleukin-15: implications for cancer therapy and vaccine design. *Nat. Rev. Immunol* 6, 595-601.
- Weiss, C. D., Levy, J. A., et White, J. M. (1990). Oligomeric organization of gp120 on infectious human immunodeficiency virus type 1 particles. *J. Virol* 64, 5674-5677.
- Weiss, L., Letimier, F. A., Carriere, M., Maiella, S., Donkova-Petrini, V., Targat, B., Benecke, A., Rogge, L., et Levy, Y. (2010). In vivo expansion of naive and activated CD4+CD25+FOXP3+ regulatory T cell populations in interleukin-2-treated HIV patients. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 107, 10632-10637.
- Weissenhorn, W., Dessen, A., Harrison, S. C., Skehel, J. J., et Wiley, D. C. (1997). Atomic structure of the ectodomain from HIV-1 gp41. *Nature* 387, 426-430.
- Wu, L., et KewalRamani, V. N. (2006). Dendritic-cell interactions with HIV: infection and viral dissemination. *Nat Rev Immunol* 6, 859-868.
- Wucherpfennig, K. W. (2004). T cell receptor crossreactivity as a general property of T cell recognition. *Mol. Immunol* 40, 1009-1017.
- Xu, X. N., Screaton, G. R., Gotch, F. M., Dong, T., Tan, R., Almond, N., Walker, B., Stebbings, R., Kent, K., Nagata, S., et al. (1997). Evasion of cytotoxic T lymphocyte (CTL) responses by nef-dependent induction of Fas ligand (CD95L) expression on simian immunodeficiency virus-infected cells. *J. Exp. Med* 186, 7-16.
- Yeni, P. (2010). *Prise en charge médicale des personnes infectées par le VIH* (France: Ministère de la Santé et des Sports de France).
- Yokomaku, Y., Miura, H., Tomiyama, H., Kawana-Tachikawa, A., Takiguchi, M., Kojima, A., Nagai, Y., Iwamoto, A., Matsuda, Z., et Ariyoshi, K. (2004). Impaired processing and presentation of cytotoxic-T-lymphocyte (CTL) epitopes are major escape mechanisms from CTL immune pressure in human immunodeficiency virus type 1 infection. *J. Virol* 78, 1324-1332.
- Zhang, Z., Zhao, Q., Fu, J., Yao, J., He, Y., Jin, L., et Wang, F. (2006). Characteristics of HIV-1-specific CD8 T-cell responses and their role in loss of viremia in children chronically infected with HIV-1 undergoing highly active antiretroviral therapy. *Chin. Med. J* 119, 1949-1957.
- Zhu, Y., Gelbard, H. A., Roshal, M., Pursell, S., Jamieson, B. D., et Planelles, V. (2001). Comparison of cell cycle arrest, transactivation, and apoptosis induced by the simian immunodeficiency virus SIVagm and human immunodeficiency virus type 1 vpr genes. *J. Virol* 75, 3791-3801.

Bibliographie

Zimbwa, P., Milicic, A., Frater, J., Scriba, T. J., Willis, A., Goulder, P. J. R., Pillay, T., Gunthard, H., Weber, J. N., Zhang, H., et al. (2007). Precise identification of a human immunodeficiency virus type 1 antigen processing mutant. *J. Virol* *81*, 2031-2038.

Zwick, M. B., Labrijn, A. F., Wang, M., Spenlehauer, C., Saphire, E. O., Binley, J. M., Moore, J. P., Stiegler, G., Katinger, H., Burton, D. R., et al. (2001). Broadly neutralizing antibodies targeted to the membrane-proximal external region of human immunodeficiency virus type 1 glycoprotein gp41. *J. Virol* *75*, 10892-10905.

Liens Internet:

<http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/HIV/CRFs/CRFs.html>

Rapports UNAIDS:

[http://data.unaids.org/pub/GlobalReport/2008/JC1511 GR08 ExecutiveSummary fr.pdf](http://data.unaids.org/pub/GlobalReport/2008/JC1511_GR08_ExecutiveSummary_fr.pdf)

[http://data.unaids.org/pub/Report/2009/JC1700 Epi Update 2009 en.pdf](http://data.unaids.org/pub/Report/2009/JC1700_Epi_Update_2009_en.pdf)

VII. Annexes

A. Article 1

The immune response to the RT181-189 epitope in HIV-1 infected patients is associated with
viral sequence polymorphism flanking the epitope

Yovana Pacheco, Clotilde Allavena, Yannick Guilloux, Sandra Mueller;

Angela Hueckelhoven, Elisabeth André-Garnier, Virginie Ferre, Audrey Rodallec, Eric Billaud, Thomas Harrer,

François Raffi, MD; Dorian McIlroy.

Article soumis à *Journal of Clinical Immunology*

The immune response to the RT181-189 epitope in HIV-1 infected patients is associated with viral sequence polymorphism flanking the epitope

Yovana Pacheco¹, Clotilde Allavena^{1,2}, Yannick Guilloux³, Sandra M. Mueller⁴, Angela Hueckelhoven⁴, Elisabeth André-Garnier^{1,5}, Virginie Ferré^{1,5}, Audrey Rodallec⁵, Eric Billaud², Thomas Harrer⁴, François Raffi^{1,2}, and Dorian McIlroy^{1*}

- EA4271 Laboratoire d'Immunovirologie et Polymorphisme Génétique, Université de Nantes, Nantes, France
- Service d'Infectiologie, Hôtel-Dieu, Nantes, France
- UMR INSERM 892, Nantes, France
- Department of Internal Medicine 3, University Hospital Erlangen, Krankenhausstrasse 12, 91054 Erlangen, Germany
- Laboratoire de Virologie, Hôtel-Dieu, Nantes, France

* Correspondence and enquiries should be addressed to : Dr Dorian McILROY, EA4271 Facultés de Médecine et de Pharmacie, 1 rue Gaston Veil, 44035 Nantes.

Tel. + 33 2 40 41 28 39 Fax + 33 2 40 41 29 52

email : dorian.mcilroy@univ-nantes.fr

Running Head : CTL response to HIV-1 RT181-189

List of abbreviations:

ART: Antiretroviral treatment.

SFC: Spot-forming Cells

VF: Virological failure

VL: Viral Load

3TC: Lamivudine

Abstract

Many drug resistance mutations in HIV-1 reverse transcriptase fall within CTL epitopes, but studies of the response to these epitopes in patients with virological failure are lacking. We therefore compared IFN γ ELISPOT responses to the YV9 epitope (RT181-189) covering the lamivudine resistance mutation, M184V, in HLA-A2⁺ antiretroviral treatment (ART)-naive patients (n=19), to those found in HLA-A2⁺ patients with virological failure (n=15). Ten ART-naive patients had an ELISPOT response to the wild-type epitope that cross-reacted with the mutant epitope. Two patients with virological failure showed a specific response to the 184V mutant epitope. Responses against YV9 were strongly associated (p=0.005) with the presence of a 177E mutation, and the same tendency was observed in an independent cohort of patients (n=22). These results indicate that variants in flanking residues may influence CTL responses to conserved subdominant HIV-1 epitopes.

Keywords : Cytotoxic T-lymphocytes, T-cell epitope, HIV Reverse Transcriptase, Antiviral Drug Resistance

Introduction

Cytotoxic T-lymphocytes (CTL) play an important role in the control of HIV replication, both during primary (1) and chronic infection. CTL with many different specificities are involved in the control of viral replication during acute infection (2), while in chronic infection several groups have reported that Gag-specific CTL are associated with lower VL (3-6), indicating a major role for Gag-specific CTL in limiting HIV replication. However, associations between HIV sequence polymorphisms in the Pol and Nef genes, and the HLA class I genotype of the infected individual have provided evidence that CTL directed against epitopes in HIV protease (PR), reverse transcriptase (RT) and Nef proteins also exert selection pressure on the virus during chronic infection (7, 8).

Most studies of the antiviral effects of CTL have involved antiretroviral-naïve patients, and much less is known concerning the role of CTL in patients undergoing anti-retroviral therapy (ART). Although several studies have documented a reduction in the frequency of HIV-specific CTL in the peripheral blood after the initiation of ART (9-11), HIV-specific CTL can still be detected in patients after suppression of viral replication, and one recent longitudinal study has shown that these CTL recover multiple effector functions with prolonged ART (12). It is currently not known whether the HIV-specific CTL that are present during ART can suppress the residual viremia that remains despite effective ART (13), or limit virological failure (VF) due to the accumulation of drug-resistance mutations. Nevertheless, since many drug-resistance mutations in the HIV PR and RT fall within CTL epitopes (14-19), it has been proposed that CTL directed against these epitopes might limit the replication of drug-resistant viruses.

These previous studies have defined which drug-resistance mutations can be targeted by CTL, but for the most part they concerned patient groups with diverse drug-resistance

mutations, occurring within several different CTL epitopes restricted by a variety of HLA molecules. For each particular epitope/drug-resistance mutation combination, the number of patients studied was small, making it difficult to reach conclusions concerning the frequency of these CTL responses in patients with drug-resistant virus, and their role *in vivo*. One exception was the report by Karlsson *et al.* who studied the response to the HLA-A2 restricted PR76-84 epitope. They found that most HLA-A2⁺ patients with protease inhibitor (PI)-resistant virus had a detectable response to this epitope (16), even though it was infrequently targeted in untreated HLA-A2⁺ patients (20).

In order to test whether these findings can be generalized to other epitopes containing drug-resistance mutations, we chose to study the CTL response against epitopes covering the M184V mutation in RT that confers resistance to lamivudine (3TC)(21) and emtricitabine (FTC). Our choice was motivated by three main factors. Firstly, 3TC and FTC are unique among the nucleotide RT inhibitors, in that a single mutation at position 184 confers complete (>1000-fold) resistance to the drug. Hence, almost all patients with VF under ART incorporating 3TC or FTC harbor viruses with a resistance mutation at position 184, predominantly 184V. Secondly, the M184V mutation carries a well characterized fitness cost to the virus, and is therefore not detectable in antiretroviral-naïve patients. Thirdly, the two epitopes described in the literature as covering the M184V mutation, VL9 (RT179-187) (22) and YV9 (RT181-189) (14), are restricted by HLA-A2, which is the most frequent HLA class I allele. Nevertheless, it is still unclear from the literature which of the two reported HLA-A2 restricted epitopes is dominant, and there is currently no data concerning CTL responses directed against either of the two epitopes in patients with active replication of 3TC-resistant virus.

We therefore compared the frequency and magnitude of IFN γ ELISPOT responses to the VL9 and YV9 epitopes in HIV-infected antiretroviral-naïve patients and patients with VF

despite ART incorporating 3TC. Peptides representing both the wild-type and the 184V sequences were systematically tested, as were peptides representing the immunodominant HLA-A2 restricted epitopes in Gag and RT. We found that the YV9 epitope, but not VL9, was frequently targeted in HLA-A2⁺ patients, and that the presence of an ELISPOT response to YV9 was correlated with viral load and viral sequence polymorphism upstream of the epitope. These two factors explained why most of the patients we studied with VF did not generate a CTL response specifically targeting the M184V mutation, and overall our results confirm that naturally occurring variants in flanking residues can influence the development of CTL responses to conserved subdominant HIV-1 epitopes.

Patients and Methods

1. Patients

In Nantes, two groups of HIV-infected patients were enrolled in the study from March 2006 to April 2008: patients who had never received any antiretroviral treatment ("ART-Naive" Group) and patients with virological failure (VL > 50 copies/ml) despite antiretroviral therapy (ART) including 3TC, or patients whose viral genome sequencing had shown the presence of the M184V mutation in the previous 12 months ("3TC" group). One patient receiving lamivudine monotherapy for concurrent HBV infection was also included in the 3TC Group. All patients gave informed consent and the study was authorized by the Nantes University Hospital ethical review board.

In Erlangen, 21 patients receiving ART and one patient during treatment interruption were enrolled from February 2008 to July 2010.

2. Cell preparation and flow cytometry

On the occasion of one of their regular hospital visits, participating patients gave 15 mL peripheral blood collected on heparinized tubes and PBMC were isolated by ficoll density gradient centrifugation. Cells were cryo-preserved in 50% FCS, 40% RPMI, 10% DMSO in liquid nitrogen. HLA-A2⁺ patients were identified by flow cytometry after staining whole blood with Phycoerythrin (PE) conjugated anti-HLA-A2 (clone BB7.2, Serotec, Cergy St Christophe, France). PBMC from HLA-A2⁺ patients were thawed, and used for further experiments.

The phenotype of CD4⁺ and CD8⁺ lymphocytes was studied by staining cryopreserved PBMC with the following monoclonal antibody combinations; CD4/CD8/HLA-DR/CD38, CD4/CD8/CD27/CD28, CD4/CD8/IgG2a and CD4/CD8/CD279. All antibodies used were from BD Biosciences (Pont de Claix, France). Data was acquired on a FACS Canto flow

cytometer, and analyzed using FACS Diva software.

3. IFN γ ELISPOT assay

IFN γ secretion by viral peptide-specific CD8⁺ T cells was quantified by the ELISPOT assay performed as previously described (23). Briefly, 96-well nitrocellulose plates (Millipore, Molsheim, France) were coated with 1 μ g/mL mouse monoclonal anti-human IFN γ (clone 1-D1-K, Mabtech, Sophia Antipolis, France) overnight at 4°C. Plates were washed, then blocked for two hours at 37°C with complete medium (RPMI 1640 containing 10% FCS, 4mM L-glutamine, 50 U/mL penicillin and 50 μ g/ml streptomycin). Cells were plated in triplicates at 1×10^5 viable cells per well and stimulated with different peptides (NeoMPS, Table 1) at a final concentration of 3 μ M. Positive control wells were plated at 1500 viable cells per well and stimulated with PMA (500ng/ml) + ionomycin (50ng/ml). Plates were incubated overnight at 37°C with 5% CO₂. Wells were washed with PBS 0.05% Tween 20, and filled with 100 μ L of biotinylated monoclonal mouse anti-human IFN γ antibody (Clone 7-B6, Mabtech, Sophia Antipolis, France) at 1 μ g/mL, followed by alkaline phosphatase-labeled extravidin (Sigma, St Quentin Fallavier, France). Finally spots were developed with BCIP/ NBT reagent (Sigma).

IFN γ spot forming cells (SFC) were counted using an automated ELISPOT reader (Autoimmun Diagnostika Gmbh, Strassberg, Germany) and their number expressed as SFC/10⁶ PBMC. Signals were considered positive if the mean value of the triplicate was greater than (1) the mean + 2 SD of negative control wells and (2) mean of negative control wells + 50 SFC/10⁶ PBMC.

4. CTL Lines and Clones.

CTL lines were generated by stimulating PBMC with the 10 μ M YV9M peptide for 3 hours, then sorting IFN γ secreting cells using magnetic beads following the manufacturer's

instructions (MACS, Miltenyi, Paris, France), which were cultured with 1 µg/mL PHA-L + 150 U/mL IL-2 together with irradiated feeder cells (1×10^4 EBV-B cells + 1×10^5 PBMC from an unrelated donor per well) in U-bottomed 96-well plates. Clones were obtained by limiting dilution, and clonality was confirmed by TCR sequencing.

For patients analyzed in Erlangen, short-term cultures were performed before testing for peptide-specific responses. 5×10^6 PBMC were stimulated with 6 µg/mL YV9 peptide in 1 ml with complete medium supplemented with 10 mM HEPES and 10 U/mL recombinant interleukin-2 (Proleukin, Chiron, CA, USA). After 10 days cells were tested for recognition of the YV9 peptide in a gamma-IFN ELISPOT assay as described above.

5. Functional avidity

The 5A11 CTL clone was stimulated by serial peptide dilutions (from 3 µM to 0.3 pM) of the YV9M and YV9V peptides using 200 effector cells per well, together with 30 000 HLA-A2⁺ EBV-B cells as targets. IFNγ SFC were counted at each dilution, and EC50 (concentration required to induce half-maximal number of SFC) were calculated using the NCGC Curve Fit software (<http://ncgc.nih.gov/pub/openhts/curvefit/>).

6. HIV-1 RT sequencing

Viral RNA was purified from plasma samples using a MagnaPure LC instrument (Roche), and the N-terminal and central domains of the RT gene were then amplified using a one-step RNA PCR kit (Takara Bio, distributed by Lonza, St-Beauzire, France) and the following primers : MJ4C – AGTGCTTTGGYYCCCCTRAGGAGT; MJ3 AGTAGGACCTACACCTGTCA. PCR products were purified, sequencing reactions were performed using a BigDye Terminator kit and analyzed on a 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

7. Statistics.

Quantitative variables (VL, CD4 counts, SFC counts) were compared by the Wilcoxon Two Sample test (http://www.fon.hum.uva.nl/Service/Statistics/Wilcoxon_Test.html). For paired data the Wilcoxon Signed-Rank test (http://www.fon.hum.uva.nl/Service/Statistics/Signed_Rank_Test.html) was used. Qualitative values (positive or negative response to peptide stimulus) were compared by two-tailed Fisher exact test (<http://statpages.org/ctab2x2.html>). All calculations were carried out using web-based resources listed at <http://www.statpages.org>. Differences were considered significant when $p < 0.05$.

B.Results

1.Clinical, immunological, and virological characteristics of patient groups

The "ART-naïve" group consisted of 19 HLA-A2⁺ ART-naive patients. The "3TC group" was composed of 15 HLA-A2⁺ patients who either 1) had ongoing VF despite receiving ART incorporating 3TC or 2) harbored drug-resistant virus with the M184V mutation documented within the previous 12 months. Median age and peripheral CD4⁺ T-lymphocyte counts were similar in the two groups, while VL ($p=0.003$) and nadir CD4 counts ($p<0.001$) were significantly lower in the 3TC group (Table 2). In addition, the proportion of activated CD38⁺HLA-DR⁺ CD8⁺ T-lymphocytes was significantly lower in the 3TC group, although the proportion of differentiated CD27⁻CD28⁻ effector CTL, and the level of expression of PD-1 in the total CD8⁺ lymphocyte population were equivalent in ART-naive and 3TC patients (Table 2).

2. A high proportion of treatment-naive HLA-A2⁺ patients generate a cross-reactive response to the YV9 epitope

M peptide (Median: 177, range: 52-1100 SFC/10⁶ PBMC), and 9 patients also recognized YV9V (Median: 110 range: 57-1086 SFC/10⁶ PBMC). In comparison, 8/19 ART naive patients had an ELISPOT response against the IV9 epitope in RT (Median: 343, range: 116-1807 SFC/10⁶ PBMC), and 10/19 showed a response against the SL9 Gag epitope (Median: 191.5, range 63-2140 SFC/10⁶ PBMC)(Figure 1A). Therefore, in antiretroviral-naive patients, ELISPOT responses against YV9 were similar, both in frequency and in magnitude to those directed against the dominant HLA-A2 restricted CTL epitopes in RT and Gag. In contrast, no ELISPOT responses against the VL9 epitope were detected in the 17 ART-naive patients tested with the VL9M and VL9V peptides.

As expected, the M184V mutation was not detectable in circulating virus from ART-

naive patients (data not shown). Hence, recognition of the YV9V peptide by PBMC from treatment-naive patients cannot be due to an immune response generated against virus bearing 184V, but could represent cross-reactivity of the CTL response generated against wild-type virus expressing the YV9M epitope. Indeed, ELISPOT responses against YV9V in the ART-naive patient group were strongly correlated with responses against YV9M (Figure 1B). The same patients responded to both peptides, and since the slope of the regression equation was equal to 1, the number of cells responding to each peptide was the same in each patient. This strongly implies that the same cells responded to both peptides, as it is extremely unlikely that two different populations of CTL with distinct specificities (i.e. YV9M-specific CTL and YV9V-specific CTL) would be so similar in number in all ten patients. Indeed, ELISPOT responses against YV9V and IV9, a different epitope in RT, were entirely independent (Figure 1C). Furthermore, a CTL clone specific for the YV9M peptide obtained from treatment-naive patient 181 also recognized the YV9V peptide. The functional avidities of the clone for the two peptides were identical (Figure 1D), proving that a single TCR can recognize both peptide-HLA-A2 complexes with equal efficacy.

Four patients in the ART-naive group with ELISPOT responses to YV9M subsequently received ART. ELISPOT responses against YV9 were tested in these individuals one year after initiation of ART in order to determine how ELISPOT responses against YV9M evolve under ART. Three of the four patients achieved a full virological response, but despite the suppression of viral replication, these three patients maintained a detectable response against YV9M and YV9V (Figure 2A, 2B, 2D). In the fourth patient, ELISPOT responses against both YV9M and YV9V were undetectable one year after the initiation of ART (Figure 2C). These results indicate that ELISPOT responses against YV9M generated before the initiation of ART can persist at a detectable level during ART.

3. Memory response to YV9M and specific recognition of YV9V in 3TC patients

ELISPOT responses against the HLA-A2 restricted epitopes SL9 and IV9 in the 3TC group (Figure 3A) were equivalent, both in terms of frequency and magnitude, to those observed in the ART-naive group, and 4/15 patients in the 3TC group had a positive ELISPOT response to YV9. Although the frequency of responses to YV9 was somewhat lower in the 3TC group compared to the ART-naive group, this difference was not significant ($p=0.17$ Fisher's Exact test). As in ART-naive patients, no ELISPOT responses were detected against either the VL9M or VL9V peptides in patients with 3TC-resistant virus.

Two distinct types of response to the YV9 epitope were observed in the 3TC group. As seen in the ART-naive group, the ELISPOT response in patients 180 and 228 cross-reacted with YV9M and YV9V suggesting that the YV9-specific response in these patients represented memory CTL initially generated against wild-type virus before the initiation of ART.

In contrast, patients 48 and 193 had a positive ELISPOT response against YV9V but not YV9M, indicating that these patients had generated an immune response specifically directed against 3TC-resistant virus (Figure 3A). Both these patients had persistent VF, with resistant virus detectable for more than six months before recruitment into the study. However, this was also the case for seven patients who had no detectable ELISPOT response to the YV9M or YV9V peptides (Figure 3C). Prolonged replication of 3TC-resistant virus therefore appeared to be necessary, but not sufficient, for the generation of a specific CTL response to virus harboring the 184V mutation.

In addition, unlike other patients in the 3TC group, virus sequences from these two patients carried a D177E mutation at position 177 in RT (data not shown). In order to test whether the presence of 177E was correlated with a detectable ELISPOT response to YV9, we pooled data from both ART-naive and 3TC groups. Sequences were obtained from 18 ART-

naive patients, so sequences from a total of 33 patients were considered. Overall, eight patients carried the 177E mutation, of whom seven had an ELISPOT response to either YV9M or YV9V. Among the 25 patients whose virus did not harbor 177E, only seven had a detectable ELISPOT to the YV9 epitope (Figure 4). The presence of an ELISPOT response against YV9 was therefore associated with the presence of the 177E mutation in plasma virus ($p=0.005$, Fisher's Exact test). Logistic regression showed that this association was independent of both patient group and any of the immunological parameters that we measured (current and nadir CD4 count, and percentage of activated, effector or exhausted CD8⁺ T-cells). However, in a two-factor model, the presence of a YV9 specific ELISPOT response was strongly associated with 177E in plasma virus ($p<0.02$) and marginally associated with plasma VL ($p=0.06$).

To confirm the association between the 177E mutation and immune response to the YV9 epitope, data were obtained from an independent cohort of patients. As these patients were receiving ART, PBMC cultures were stimulated with YV9 peptide for 10 days before testing for the presence of YV9-specific cells by IFN γ ELISPOT. Despite this difference in methodology, a higher frequency of YV9-specific responses in patients carrying viruses with 177E was also seen in this group of patients, although the association was not statistically significant (Figure 4).

Discussion

Two overlapping HLA-A2 restricted epitopes, VL9 (22) and YV9 (14) covering the M184V resistance mutation have previously been reported. Here, we show that in ART-naive patients the frequency and magnitude of ELISPOT responses directed YV9 were similar to those observed against IV9 (RT 309-317), which is considered to be the dominant HLA-A2 restricted epitope in RT. However, no ELISPOT responses directed against the VL9 epitope were detected, consistent with the results of a previous study in which CTL directed against VL9 were not detected in a cohort of 51 HLA-A2⁺ HIV⁺ patients (24). Because VL9 contains the highly conserved YMDD motif from the active site of the enzyme, this epitope has been suggested as a candidate antigen for immunotherapy against HIV (17, 25, 26). It will be necessary to compare the anti-viral activity of VL9-specific and YV9-specific CTL in order to determine which of these two peptides would be the better target for immunotherapy.

The ELISPOT response against the wild-type YV9M peptide was maintained after the initiation of ART in three out of four patients studied longitudinally. This was somewhat unexpected, as it is well established that the number of circulating HIV-specific CD8⁺ T-cells declines after the onset of ART (9-11). Interestingly, plasma virus in the three patients whose ELISPOT response to YV9 was maintained after the initiation of ART carried the 177E polymorphism, while plasma virus in the patient whose ELISPOT response disappeared after the initiation of ART was 177D. These longitudinal data therefore confirm the associations between the presence of the YV9 ELISPOT response, polymorphism at RT position 177 and plasma VL that we found in the cross-sectional analysis, and suggest that a higher antigenic threshold may be necessary for the development and maintenance of a response against the YV9 epitope when plasma virus contains 177D.

In patients with VF due to 3TC-resistant virus, we found two distinct types of YV9-

specific response. Firstly, CTL that recognized both YV9M and YV9V, probably representing a memory response generated before the initiation of ART, were present in two patients. Secondly, two patients had an ELISPOT response specifically directed against drug resistant virus. That this occurred infrequently in the patients we studied shows that the tendency observed by Karlsson et al. for CTL responses against the PR76-84 epitope to increase in patients with drug-resistant virus (20) cannot be extended to all epitopes covering drug-resistance mutations.

Two factors correlated with the generation of an immune response to YV9V in 3TC patients; persistent replication of drug-resistant virus, and presence of a polymorphism, 177E, in the N-terminal flanking region of the epitope.

The requirement for a prolonged period of replication of 3TC-resistant virus is consistent with what is known concerning the development of CTL responses against epitope variants during chronic infection(27, 28). In these studies, there was a lag of several months between the appearance of the epitope variant in the viral quasispecies, and the detection of a CTL response directed against the variant. We do not know how long ELISPOT responses against YV9V had been present in patients 193 and 48 before study entry. However, VF continued after their inclusion into this study, showing that 3TC-resistant virus continued to replicate, despite the presence of CTL specifically recognizing the 184V resistance mutation in these two patients. Overall, these observations suggest that CTL specific for YV9V can arise in patients with 3TC-resistant virus as a response to active viral replication, but they do not reveal an anti-viral role for these CTL *in vivo*. Furthermore, VF can now be rapidly controlled in most patients by modifying the therapeutic regime, and failure to achieve full suppression of viral replication is restricted to a small number of patients with multiple drug resistance mutations. With more options for salvage therapy, the number of patients who have persistent VF is likely to decrease even further. It is therefore probable that immune responses

specifically targeting M184V will remain relatively rare in HLA-A2⁺ patients receiving ART.

With regards to the second point, a higher frequency of ELISPOT responses against the YV9 epitope in patients carrying viruses with the 177E mutation was also observed in treatment-naïve patients in the Nantes cohort, and in an independent group of patients with ongoing ART. Although data from both sites showed that more than 80% of patients whose virus carried 177E mounted a response to the YV9 epitope, there was a higher frequency of YV9-specific responses in patients without 177E in the Erlangen cohort. This may have been related to methodological differences between the two sites, as ELISPOT responses were tested after the expansion of peptide-specific CTL in culture in Erlangen, whereas in Nantes, ELISPOT responses were tested directly on thawed PBMC. Higher sensitivity of the assay used in Erlangen could therefore have resulted in more responses being detected in patients without 177E.

The association between ELISPOT responses against the YV9 epitope and the 177E sequence could be explained by altered antigen processing, since previous studies have shown that mutations in N-terminal flanking residues can modify epitope processing and presentation (29, 30). Indeed, based on the effects of sequence polymorphism on antigen processing, Tenzer and colleagues suggested that "the specific sequence of any transmitted virus may affect the likelihood of CTL priming"(31). The strong positive correlation between the presence of 177E and the detection of an ELISPOT response against YV9 that we observed seems to confirm this prediction, and to the best of our knowledge, constitutes the first reported example of such an effect.

However, other factors may also contribute to the association that we observed. In particular, virus subtype is a potential confounding factor, since 177E is frequently found in the RT of non-subtype B viruses. Furthermore, the D177E mutation falls within a HLA-B35 restricted epitope, RT175-183, and there is evidence that D177E in subtype B viruses is an

escape mutation against this HLA-B35 restricted response (8). Since we did not measure responses against the RT175-183 epitope, it is not possible for us to exclude the possibility that interactions between the CTL responses against the two overlapping epitopes, RT175-183 and YV9 (RT181-189) could lead to unexpected associations between RT sequence polymorphisms and observed ELISPOT responses to the YV9 epitope.

In conclusion, we have shown that although CD8⁺ T-cell responses against the YV9M epitope occur frequently in treatment-naïve patients, most patients with 3TC-resistant virus do not develop an immune response specifically directed against the YV9V epitope that carries the M184V resistance mutation. Questions arising from this work include whether YV9-specific CTL can inhibit the replication of HIV, in particular 3TC-resistant virus, and whether the 177E polymorphism does indeed affect processing and presentation of the YV9 epitope.

Acknowledgments

This work was supported by the Association de Recherche sur le SIDA et les Infections des Immunodéprimés (ARSIID), and grants from the DFG (DFG grant HA 2331/2-1) and the Hector Foundation (TH), IZKF (TH: A27). Y.P. was the recipient of a scholarship awarded by the Région des Pays de la Loire. The authors would like to thank Bernard Besse and Olivier Barre for HIV-1 RT gene sequencing, and Christelle Retière and Anne Hosmalin for useful comments on the manuscript. We would particularly like to thank the patients who agreed to participate in this study.

Conflict of Interest:

The author declares no financial or commercial conflict of interest.

C.Tables***1. Table 1: ELISPOT assay peptides.***

Peptide	Sequence	Target Protein	Position in Protein
VL9M	VIYQYMDDL	RT	179-187
VL9V	VIYQYVDDL	RT	179-187
YV9M	YQYMDDLIV	RT	181-189
YV9V	YQYVDDLIV	RT	181-189
IV9	ILKEPVHGV	RT	309-317
SL9	SLYNTVATL	Gag	77-85

2.

3. Table 2: Clinical and biological parameters of each patient group.

For continuous variables, the median and range of values are shown. For HBV/HCV co-infections, the number of seropositive patients in each group is shown. MFI : Median fluorescence intensity.

	ART-Naive (n=19)	3TC (n=15)	p	
Age	43 (24-58)	45 (30-72)	0.640	
VL (log)	4.7 (<1.6-6.4)	2.8 (<1.6-3.8)	0.003	
CD4/mm³	532 (95-949)	336 (64-1006)	0.499	
Nadir CD4/mm³	354 (95-763)	170 (22-268)	<0.001	
HBV⁺	0	2	0.187	
HCV⁺	2	4	0.173	
CD8+ T-cell phenotype	% CD38⁺HLA-DR⁺	35 (6-67)	15 (3-47)	<0.01
	% CD27⁻CD28⁻	49 (12-62)	38 (17-57)	0.2708
	PD1 (MFI)	541(386-811)	567(296-836)	0.8542

D. Figure Legends

1. Figure 1. Cross-reactive IFN- γ ELISPOT response against YV9M and YV9V in ART-

Naive patients

(A) IFN- γ ELISPOT responses against HLA-A2 restricted epitopes SL9, IV9 and YV9 in ART-naive patients. Only positive responses (mean value of the triplicate $>$ mean + 2 SD of negative control wells and $>$ 50 SFC/ 10^6 PBMC above negative control wells) are shown.

(B) Strong correlation between ELISPOT responses to the YV9M and YV9V peptides in HLA-A2⁺ ART-naive patients. Patients with a positive ELISPOT response to either peptide (●) and those with a negative response to both YV9M and YV9V peptides (○) are shown.

(C) No correlation between ELISPOT responses to the YV9M and IV9 peptides in HLA-A2⁺ ART-naive patients.

(D) Functional avidity of the 8D10 clone derived from patient 181 against YV9M and YV9V peptides.

2. Figure 2. YV9-specific ELISPOT persists after initiation of ART

Line graphs shows evolution of VL (right-hand scale) after initiation of ART with treatments as indicated (EFV-Efavirenz; TDF – Tenofovir; FTC – Emtricitabine; SQV – Saquinavir; RTV – Ritonavir; ZDV – Zidovudine; 3TC – Lamivudine; ATV-Atazanavir). Open bars represent IFN- γ ELISPOT response (left-hand scale) to YV9M; closed bars represent responses to YV9V. Time is indicated as the number of days after initiation of ART.

3. Figure 3. Selective IFN- γ ELISPOT response against YV9V in two 3TC patients is associated with Persistent VF while YV9M / YV9V cross-reactive responses can be found in patients with transient VF

(A) IFN γ ELISPOT responses against HLA-A2 restricted epitopes SL9, IV9 and YV9 in patients with VF despite ART incorporating 3TC. Only positive responses (mean value of the triplicate $>$ mean + 2 SD of negative control wells and $>$ 50 SFC/ 10^6 PBMC above negative control wells) are shown. For YV9, responses against YV9M and YV9V are shown for each 3TC subject responding to one of the two peptides. Patient code numbers are shown in the inset box.

(B) VL over the year preceding study entry in patients (n=6) with transient VF (detectable plasma virus for $<$ 6 months). Patients 180 and 228 are indicated by bold lines.

(C) VL over the year preceding study entry in patients (n=9) with persistent VF (detectable plasma virus for $>$ 6 months). Patients 193 and 48 are indicated by bold lines.

4. Figure 4. Correlation between RT177E polymorphism and presence of a detectable ELISPOT response against the YV9 epitope

The inset figures above each column show the number of patients responding to the YV9 peptide over the number of patients tested. Statistical significance was tested by Fisher's Exact test.

References

1. **Koup, R.A., Safrit, J.T., Cao, Y., Andrews, C.A., McLeod, G., Borkowsky, W., Farthing, C. et al.**, 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 (1994)
2. **Jones, N.A., Wei, X., Flower, D.R., Wong, M., Michor, F., Saag, M.S., Hahn, B.H. et al.**, Determinants of human immunodeficiency virus type 1 escape from the primary CD8+ cytotoxic T lymphocyte response. *J Exp Med.* **200**: 1243-1256 (2004)
3. **Edwards, B.H., Bansal, A., Sabbaj, S., Bakari, J., Mulligan, M.J. & Goepfert, P.A.**, Magnitude of functional CD8+ T-cell responses to the gag protein of human immunodeficiency virus type 1 correlates inversely with viral load in plasma. *J Virol.* **76**: 2298-2305 (2002)
4. **Zuñiga, R., Lucchetti, A., Galvan, P., Sanchez, S., Sanchez, C., Hernandez, A., Sanchez, H. et al.**, Relative dominance of Gag p24-specific cytotoxic T lymphocytes is associated with human immunodeficiency virus control. *J Virol.* **80**: 3122-3125 (2006)
5. **Geldmacher, C., Currier, J.R., Herrmann, E., Haule, A., Kuta, E., McCutchan, F., Njovu, L. et al.**, CD8 T-cell recognition of multiple epitopes within specific Gag regions is associated with maintenance of a low steady-state viremia in human immunodeficiency virus type 1-seropositive patients. *J Virol.* **81**: 2440-2448 (2007)
6. **Kiepiela, P., Ngumbela, K., Thobakgale, C., Ramduth, D., Honeyborne, I., Moodley, E., Reddy, S. et al.**, CD8+ T-cell responses to different HIV proteins have discordant associations with viral load. *Nat Med.* **13**: 46-53 (2007)
7. **Moore, C.B., John, M., James, I.R., Christiansen, F.T., Witt, C.S. & Mallal, S.A.**, Evidence of HIV-1 adaptation to HLA-restricted immune responses at a population level. *Science.* **296**: 1439-1443 (2002)
8. **Brumme, Z.L., John, M., Carlson, J.M., Brumme, C.J., Chan, D., Brockman, M.A., Swenson, L.C. et al.**, HLA-associated immune escape pathways in HIV-1 subtype B Gag, Pol and Nef proteins. *PLoS One.* **4**: e6687 (2009)
9. **Kalams, S.A., Goulder, P.J., Shea, A.K., Jones, N.G., Trocha, A.K., Ogg, G.S. & Walker, B.D.**, Levels of human immunodeficiency virus type 1-specific cytotoxic T-lymphocyte effector and memory responses decline after suppression of viremia with highly active antiretroviral therapy. *J Virol.* **73**: 6721-6728 (1999)
10. **Ogg, G.S., Jin, X., Bonhoeffer, S., Dunbar, P.R., Nowak, M.A., Monard, S., Segal, J.P. et al.**, Quantitation of HIV-1-specific cytotoxic T lymphocytes and plasma load of viral RNA. *Science.* **279**: 2103-2106 (1998)
11. **Ogg, G.S., Jin, X., Bonhoeffer, S., Moss, P., Nowak, M.A., Monard, S., Segal, J.P. et al.**, Decay kinetics of human immunodeficiency virus-specific effector cytotoxic T lymphocytes after combination antiretroviral therapy. *J Virol.* **73**: 797-800 (1999)
12. **Rehr, M., Cahenzli, J., Haas, A., Price, D.A., Gostick, E., Huber, M., Karrer, U. et al.**, Emergence of polyfunctional CD8+ T cells after prolonged suppression of human immunodeficiency virus replication by antiretroviral therapy. *J Virol.* **82**: 3391-3404 (2008)
13. **Palmer, S., Maldarelli, F., Wiegand, A., Bernstein, B., Hanna, G.J., Brun, S.C., Kempf, D.J. et al.**, Low-level viremia persists for at least 7 years in patients on suppressive antiretroviral therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **105**: 3879-3884 (2008)
14. **Samri, A., Haas, G., Duntze, J., Bouley, J.M., Calvez, V., Katlama, C. & Autran, B.**, Immunogenicity of mutations induced by nucleoside reverse transcriptase inhibitors for human immunodeficiency virus type 1-specific cytotoxic T cells. *J Virol.* **74**: 9306-9312 (2000)

15. **Mason, R.D., Bowmer, M.I., Howley, C.M., Gallant, M., Myers, J.C.E. & Grant, M.D.**, Antiretroviral drug resistance mutations sustain or enhance CTL recognition of common HIV-1 Pol epitopes. *J Immunol.* **172**: 7212-7219 (2004)
16. **Karlsson, A.C., Deeks, S.G., Barbour, J.D., Heiken, B.D., Younger, S.R., Hoh, R., Lane, M. et al.**, Dual pressure from antiretroviral therapy and cell-mediated immune response on the human immunodeficiency virus type 1 protease gene. *J Virol.* **77**: 6743-6752 (2003)
17. **Schmitt, M., Harrer, E., Goldwisch, A., Bäuerle, M., Graedner, I., Kalden, J.R. & Harrer, T.**, Specific recognition of lamivudine-resistant HIV-1 by cytotoxic T lymphocytes. *AIDS.* **14**: 653-658 (2000)
18. **Stratov, I., Dale, C.J., Chea, S., McCluskey, J. & Kent, S.J.**, Induction of T-cell immunity to antiretroviral drug-resistant human immunodeficiency virus type 1. *J Virol.* **79**: 7728-7737 (2005)
19. **Mueller, Y.M., Bojczuk, P.M., Halstead, E.S., Kim, A.H.J., Witek, J., Altman, J.D. & Katsikis, P.D.**, IL-15 enhances survival and function of HIV-specific CD8⁺ T cells. *Blood.* **101**: 1024-1029 (2003)
20. **Karlsson, A.C., Chapman, J.M., Heiken, B.D., Hoh, R., Kallas, E.G., Martin, J.N., Hecht, F.M. et al.**, Antiretroviral drug therapy alters the profile of human immunodeficiency virus type 1-specific T-cell responses and shifts the immunodominant cytotoxic T-lymphocyte response from Gag to Pol. *J Virol.* **81**: 11543-11548 (2007)
21. **Gu, Z., Gao, Q., Li, X., Parniak, M.A. & Wainberg, M.A.**, Novel mutation in the human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase gene that encodes cross-resistance to 2',3'-dideoxyinosine and 2',3'-dideoxycytidine. *J Virol.* **66**: 7128-7135 (1992)
22. **Harrer, E., Harrer, T., Barbosa, P., Feinberg, M., Johnson, R.P., Buchbinder, S. & Walker, B.D.**, Recognition of the highly conserved YMDD region in the human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase by HLA-A2-restricted cytotoxic T lymphocytes from an asymptomatic long-term nonprogressor. *J Infect Dis.* **173**: 476-479 (1996)
23. **Dalod, M., Harzic, M., Pellegrin, I., Dumon, B., Hoen, B., Sereni, D., Deschemin, J.C. et al.**, Evolution of cytotoxic T lymphocyte responses to human immunodeficiency virus type 1 in patients with symptomatic primary infection receiving antiretroviral triple therapy. *J Infect Dis.* **178**: 61-69 (1998)
24. **Schmitt-Haendle, M., Bachmann, O., Harrer, E., Schmidt, B., Bäuerle, M. & Harrer, T.**, Recognition patterns of HLA-A2-restricted human immunodeficiency virus-1-specific cytotoxic T-lymphocytes in a cohort of HIV-1-infected individuals. *Viral Immunol.* **18**: 627-636 (2005)
25. **Okazaki, T., Terabe, M., Catanzaro, A.T., Pendleton, C.D., Yarchoan, R. & Berzofsky, J.A.**, Possible therapeutic vaccine strategy against human immunodeficiency virus escape from reverse transcriptase inhibitors studied in HLA-A2 transgenic mice. *J Virol.* **80**: 10645-10651 (2006)
26. **Dela Cruz, C.S., Tan, R., Rowland-Jones, S.L. & Barber, B.H.**, Creating HIV-1 reverse transcriptase cytotoxic T lymphocyte target structures by HLA-A2 heavy chain modifications. *Int Immunol.* **12**: 1293-1302 (2000)
27. **Allen, T.M., Yu, X.G., Kalife, E.T., Reyor, L.L., Lichterfeld, M., John, M., Cheng, M. et al.**, De novo generation of escape variant-specific CD8⁺ T-cell responses following cytotoxic T-lymphocyte escape in chronic human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Virol.* **79**: 12952-12960 (2005)
28. **Geels, M.J., Cornelissen, M., Schuitemaker, H., Anderson, K., Kwa, D., Maas, J., Dekker, J.T. et al.**, Identification of sequential viral escape mutants associated with altered T-cell responses in a human immunodeficiency virus type 1-infected individual. *J Virol.* **77**: 12430-12440 (2003)

29. **Le Gall, S., Stamegna, P. & Walker, B.D.**, Portable flanking sequences modulate CTL epitope processing. *J Clin Invest.* **117**: 3563-3575 (2007)
30. **Draenert, R., Le Gall, S., Pfafferott, K.J., Leslie, A.J., Chetty, P., Brander, C., Holmes, E.C. et al.**, Immune selection for altered antigen processing leads to cytotoxic T lymphocyte escape in chronic HIV-1 infection. *J Exp Med.* **199**: 905-915 (2004)
31. **Tenzer, S., Wee, E., Burgevin, A., Stewart-Jones, G., Friis, L., Lamberth, K., Chang, C. et al.**, Antigen processing influences HIV-specific cytotoxic T lymphocyte immunodominance. *Nat Immunol.* **10**: 636-646 (2009)

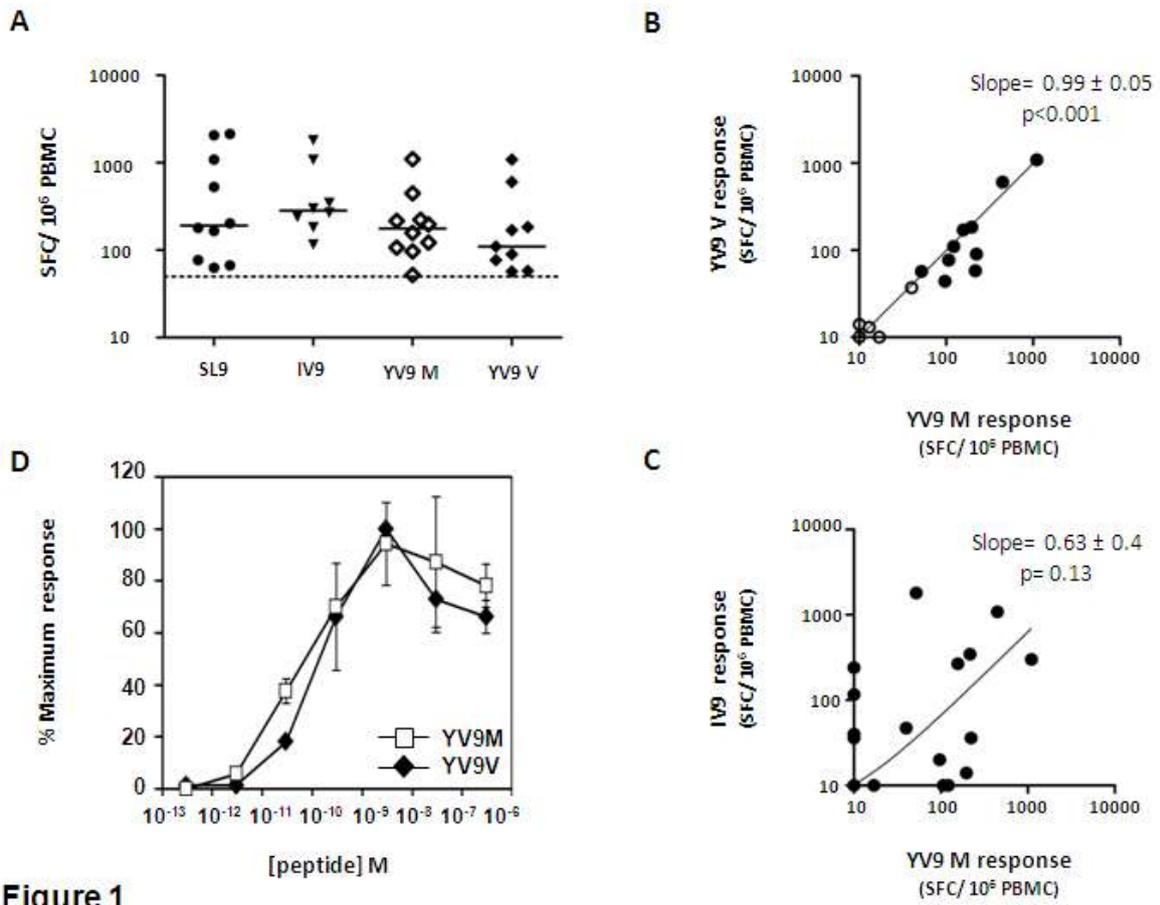


Figure 1

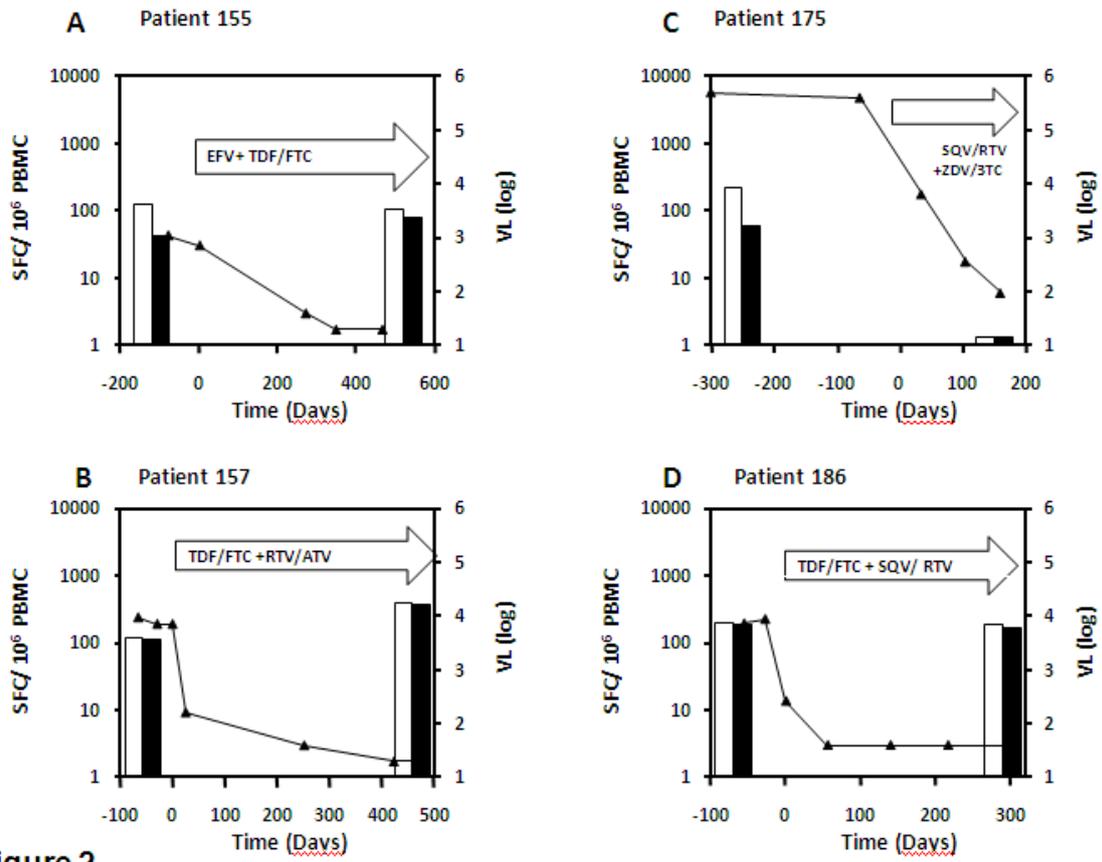


Figure 2

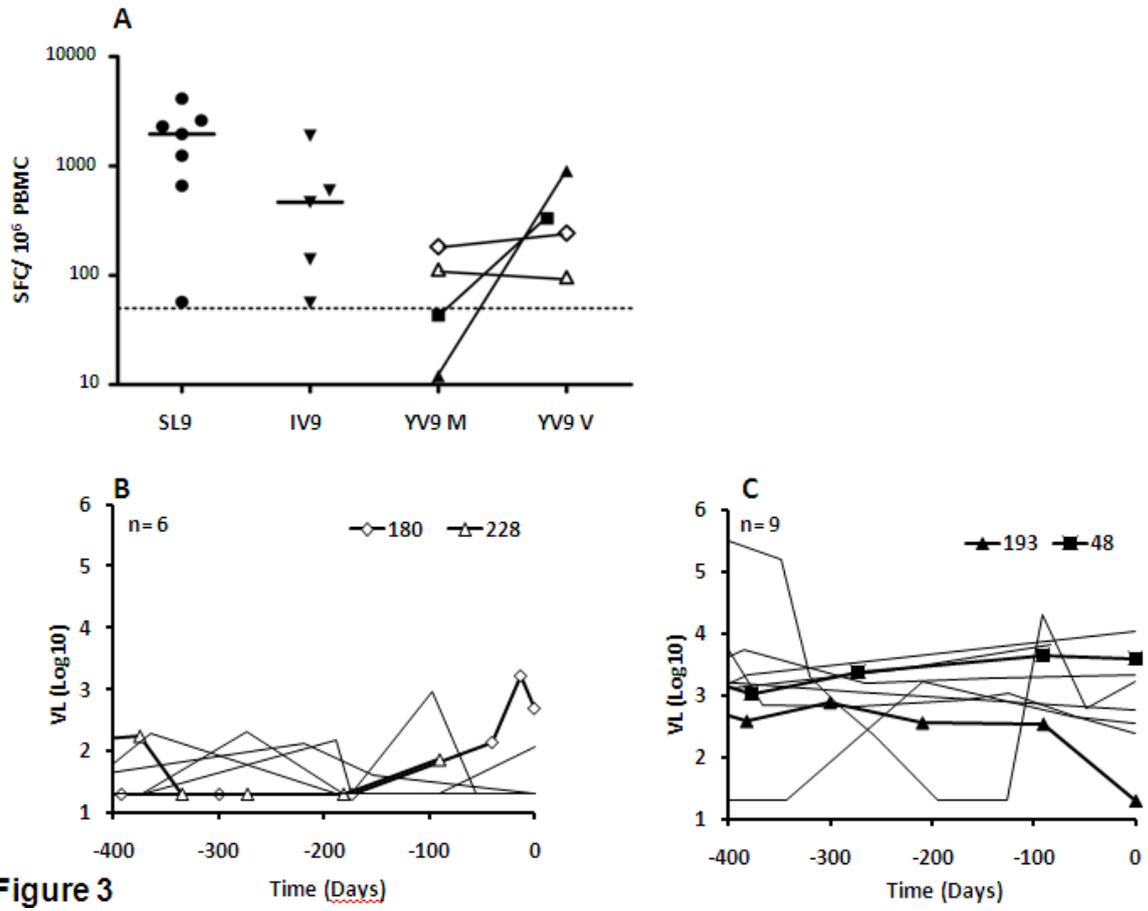


Figure 3

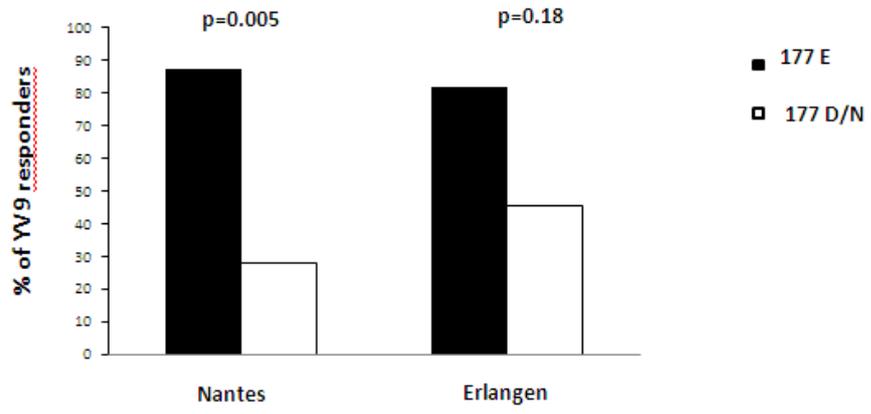


Figure 4

B. Article 2

CD4⁺ Effector-Memory cells from HIV⁺ patients show reduced proliferation in response to IL-7, but proliferate normally in response to IL-15 and its super-agonist, RLI

Yovana Pacheco, Véronique Solé, Eric Billaud, Clotilde Allavena, Ariane Plet, Virginie Ferré, Laure Garrigue-Antar, François Raffi¹, Yannick Jacques and Dorian McIlroy

Article rédigé et en attente d'une expérience supplémentaire pour être soumis.

CD4⁺ Effector-Memory cells from HIV⁺ patients show reduced proliferation in response to IL-7, but proliferate normally in response to IL-15 and its super-agonist, RLI

Yovana Pacheco¹, Véronique Solé², Eric Billaud³, Clotilde Allavena^{1,3}, Ariane Plet², Virginie Ferré¹, Laure Garrigue-Antar², François Raffi^{1,3}, Yannick Jacques² and Dorian McIlroy¹

- EA 4271 Laboratoire d'Immunovirologie et Polymorphisme Génétique, Université de Nantes, Nantes, France,
- INSERM U892, Nantes, France,
- Service d'Infectiologie, Hôtel-Dieu, Nantes, France

Summary

Cytokines of the common gamma-chain family (IL-2, IL-7 and IL-15) have been proposed as adjuvant therapies for HIV infection, either to accelerate the recovery of CD4⁺ T-cells during anti-retroviral therapy, or to enhance the activity of HIV-specific CTL. To evaluate the potential of a super-agonist of IL-15, RLI, in the context of HIV infection, we compared its effects on the apoptosis and proliferation of T-cells from HIV-infected patients with those of IL-2, IL-7 and native IL-15. RLI and IL-15 stimulated extensive proliferation of CD8⁺ T cells, with RLI proving marginally more effective (EC50=0.2nM) than IL-15 (EC50=0.35nM). Both these molecules also stimulated proliferation of CD4⁺CD45RA⁻CD27⁻ effector-memory (CD4⁺_{EM}) cells in HIV⁺ patients and HIV⁻ controls. In HIV⁺ patients, expression of the IL-7 α subunit, CD127, was reduced in CD4⁺_{EM} cells, independently of peripheral CD4⁺ T-cell counts, but was correlated with CD4⁺ T-cell counts in the CD4⁺CD45RA⁺CD27⁺ naive and CD4⁺CD45RA⁻CD27⁺ central memory subsets. Proliferation in response to IL-7 was reduced in CD4⁺_{EM} cells from viremic HIV⁺ patients compared to HIV⁻ controls. IL-15 and RLI may therefore have a unique therapeutic potential in HIV infection, as they have the capacity to stimulate proliferation of the CD4⁺ T-cell subset that shows the most severely perturbed response to IL-7.

237 words

Introduction

Over the last fifteen years combination antiretroviral therapy (ART) has dramatically reduced the risk of clinical disease progression in HIV-infected patients. Current first-line treatment regimes can effectively suppress viral replication to undetectable levels in greater than 90% of patients, and the availability of new drug families, such as integrase and fusion inhibitors has improved the management of patients with drug-resistant virus. In some patients receiving ART, however, the recovery of CD4⁺ T-cell counts is incomplete despite many years of treatment and complete suppression of viral replication. In particular, patients who delay therapy until their CD4⁺ count decreases to less than 200 cells/mm³ rarely achieve complete recovery of CD4⁺ T-cell numbers (Kelley2009). These patients would benefit from adjuvant therapies aimed at improving immune reconstitution.

As cytokines of the common γ -chain family have an essential role in T-lymphocyte homeostasis, they have been proposed as adjuvant therapies for HIV infection, in order to accelerate the recovery of CD4⁺ T-cells during anti-retroviral therapy, or to enhance the activity of HIV-specific CTL. Because of their stimulatory and anti-apoptotic properties three cytokines, Interleukin-2 (IL-2), Interleukin-7 (IL-7) (Nunnari2005) and Interleukin-15 (IL-15)(Mastroianni2004) have been advocated as potential adjuvants to ART.

The first cytokine to be studied as a therapeutic in HIV infection was IL-2, which showed proliferative and anti-apoptotic effects on CD4⁺ T-lymphocytes *in vitro* and *in vivo* (Caggiari2000) (Levy2003) . Nevertheless, recent results from two large randomized controlled trials in HIV-infected patients receiving IL-2 in combination with ART, did not show clinical benefits compared to ART alone, despite a substantial and sustained increase in CD4⁺ cell count (Abrams2009). IL-2 therapy results in preferential expansion of CD4⁺CD25⁺ cells that have regulatory T-cell (Treg) function, rather than naïve or memory CD4⁺ T-cells (Sereti2005)(Weiss2010). The clinical shortcomings of IL-2 therapy therefore seem to be

related to the limited ability of IL-2 to stimulate proliferation of both naive CD4⁺ T-cells, necessary for the reconstitution of a diverse TCR repertoire which would enable the immune system to respond correctly to new pathogens, and memory CD4⁺ T-cells, which are responsible for anamnestic responses.

Another potential molecule for HIV treatment is IL-7. Recent stage I/II trials have confirmed that IL-7, used in conjunction with ART, can increase CD4⁺ T-cell counts in HIV⁺ patients (Sereti2009)(Levy2009). In contrast to IL-2, both naive and memory CD4⁺ T-cells proliferate in response to IL-7, which lends support to the view that the clinical response to IL-7 therapy will be better than that observed with IL-2. Nevertheless, some questions remain concerning the potential efficacy of IL-7 therapy in HIV infection, due to the perturbation of the IL-7/IL-7r system in HIV⁺ patients. In particular, several studies have reported downregulation of the α chain of the IL-7 receptor, CD127, on CD4⁺ T-cells of HIV-infected patients (Rethi2005)(Koesters2006) (Benito2008) and defects in IL-7R signalling (Bazdar2009)(Camargo2009)(Juffroy2010). Since IL-7R α expression is more severely reduced in patients with advanced disease(Rethi2005) (Koesters2006), IL-7 may not be so effective in the patients who would most benefit from adjuvant therapy to aid CD4⁺ T-cell reconstitution.

Finally, the possibility that IL-15 could aid immune reconstitution in HIV⁺ patients has also been investigated, because of its positive effects on innate and adaptive immune responses. IL-15 is known to have a major role in the homeostasis and functional maturation of NK and CD8⁺ cells (Kennedy2000)(Judge2002) and more recently its importance in the homeostatic proliferation of memory CD4⁺ cells has also been recognized (Surh2008). In particular, in the mouse it has been shown that the maintenance of anti-viral effector memory T-cells is dependent on IL-15 (Purton2007). Compared to other cytokines the activation of target cells by IL-15 is unusual, inasmuch as the IL-15 receptor is composed of the low-

affinity IL-2/IL-15r $\beta\gamma$ heterodimer together with the α chain subunit, which may be expressed, not on the IL-15 responding cells, but rather on APCs such as activated monocytes or DC that secrete IL-15. IL-15 signalling therefore involves trans-presentation of the IL15r α -IL-15 complex on APC to the IL-2/IL-15r $\beta\gamma$ dimer expressed by T or NK lymphocytes (Dubois2002) This arrangement poses a problem for the therapeutic use of IL-15, since the levels of endogenous IL-15r α expression may limit the efficacy of exogenously added IL-15. In order to resolve this problem, two groups have independently developed recombinant fusion proteins consisting of IL-15 and different fragments of the IL-15r α extracellular domain. (Mortier2006)(Rubinstein2006) that act as IL-15 super-agonists. Indeed, the IL-15 Receptor α -sushi domain - linker – IL-15 (RLI) fusion protein developed by our group is 20-200 times more potent than native IL-15 depending on the cell line used in functional assays (Mortier2006). Although initially developed as an agent for anti-tumor immunotherapy, the role of IL-15 in maintaining anti-viral effector cells suggests that RLI could also have potential as an adjuvant therapy for HIV infection.

The aim of our study was to compare the effects of IL-2, IL-7, IL-15 and RLI on CD4⁺ and CD8⁺ lymphocytes from HIV-infected patients, in order to evaluate the therapeutic potential of RLI in HIV infection. The inhibition of spontaneous apoptosis and the induction of proliferation by these different molecules was analyzed in PBMC from untreated HIV-infected patients. The proliferative response of naïve, central-memory and effector-memory T-cell subsets was also measured. Overall our results showed that both CD127 expression and proliferative responses to IL-7 were reduced in CD4⁺ effector-memory (EM) cells from HIV⁺ patients, and that both IL-15 and RLI specifically induced proliferation of this CD4⁺ subpopulation.

Patients and Methods

Patients

This study enrolled 30 antiretroviral untreated HIV-infected adults, 23 with high CD4⁺ T-cell count (>500 cells/mm³, and a drop of less than 300 cells/mm³ in the preceding year, CD4HI group) and 7 patients with low CD4 cell count (<200/mm³ at presentation, or showing a reduction of >300 cells/mm³ CD4⁺ T-cells over the preceding year, CD4LO group). However, due to the limited volume of blood drawn, it was not possible to perform all analyses on each patient included in the study. Age, peripheral blood CD4⁺ T-cells counts, and viral load in the CD4HI and CD4LO patient groups are shown in Table 1.

All patients gave informed consent, and gave 20 mL blood samples for the study on the occasion of their regular hospital visits. CD4⁺ lymphocyte counts and plasma viral load (VL) were obtained from the hospital data base and incorporated into the study data after anonymisation. The study was authorized by the Nantes Hotel Dieu Hospital ethical review board. Regular blood donors enrolled at the Etablissement Français du Sang provided HIV⁻ control samples.

Cell preparation and culture

PBMC from heparinized blood were separated by Ficoll density gradient centrifugation. Ten million fresh cells were used to perform apoptosis assays, and proliferation assays analysing CD4⁺ sub-populations, and the remainder were cryo-preserved in 50% FCS, 40% RPMI, 10% DMSO and stored in liquid nitrogen. Cryo-preserved cells were used for bulk CD4⁺ and CD8⁺ lymphocyte proliferation assays and analysis of CD127 expression. PBMC were cultured at 37°C 5% CO₂ in 96-well plates at a concentration of 10⁶ cells per mL (10⁵ cells/well) in culture medium (RPMI medium 1640 supplemented with glutamine penicillin-

streptomycin and 10% FCS). The following cytokines were added at the beginning of the culture: IL-2 (1 nM), IL-7 (1nM), IL-15 (1nM; 0.3nM; 0.1nM) or RLI (1nM; 0.3nM; 0.1nM).

Apoptosis assay

After three days, apoptosis in CD4⁺ and CD8⁺ lymphocytes was analyzed by Annexin-V binding. Briefly, 10⁵ cells were recovered, CaCl₂ was added to a final concentration of 2.5mM, and cells were incubated with anti-CD4-PE-Cy7 ; anti-CD8-APC and Annexin V-PE for 20 minutes at room temperature. Cells were washed once with Wash Buffer (10mM HEPES, 140mM NaCl, 2,5mM CaCl₂) and fixed in Wash Buffer-0,75% formaldehyde before flow cytometry analysis.

Proliferation Assay.

Cellular proliferation was assessed using the CellTrace CFSE Cell Proliferation Kit (Invitrogen). Four million freshly isolated cells were labelled with 1µM CFSE in 0,1% Bovine serum albumin PBS for 10 minutes at 37°C. Staining was stopped by adding 8ml of cold culture medium (RPMI medium 1640 supplemented with glutamine, penicillin-streptomycin and 10% FCS), then cells were washed twice with cold culture medium, incubated five minutes on ice and washed twice. Labelled cells were stimulated by cytokines and plated as described above.

After seven days culture, cells were recovered and incubated with the following monoclonal antibody combinations: CD4-PE/CD8-APC or CD4-PE/CD27-APC/CD45RA-PECy7 (all from BD Biosciences, Pont de Claix, France) for 20 minutes at room temperature. Cells were washed once with PBS and fixed with PBS-0.75% formaldehyde before flow acquisition on a FACSCalibur instrument (BD Biosciences). Data were analyzed using FlowJo software, and expressed as the percentage of cells that had divided at least once by day 7 of culture.

CD127 expression

Frozen PBMC were thawed, resuspended in PBS-0,1% BSA(10^6 cells/ml), then stained for 30 minutes at 4°C with the following monoclonal antibody combinations CD4-Pe/CD27-APC/CD45RA-Pecy7/CD127-FITC or CD4-Pe/CD27-APC/CD45RA-Pecy7/IgG2a-FITC (Negative Control). After staining, cells were washed once then fixed in PBS-0,75% formaldehyde before analysis on a FACSCalibur instrument (BD Biosciences). Data were analysed using FlowJo software, and expressed as percentage of cells positivity stained for CD127. The following monoclonal antibodies (all from BD Biosciences, Le Pont de Claix, France) were used: anti-CD4-Pe (clone SK3); Anti-CD45RA-PeCy7 (clone L48,) Anti-CD127-FITC(clone L128), IgG2a-FITC (clone MOPC-21).

Statistics

Two group comparisons (HIV⁺ patients versus HIV⁻ controls) were carried out using the Wilcoxon Rank Sum test. With paired data (RLI versus IL-15 in different patients), Wilcoxon's Signed Rank test was used. Three group comparisons (HIV⁻ controls; HIV⁺ CD4HI patients; HIV⁺ CD4LO patients) were performed using One-way ANOVA. To compare effects of the four different cytokines in different patients we used Repeated Measures ANOVA followed by post-hoc tests performed as indicated on <http://www.graphpad.com/quickcalcs/posttest1.cfm>. Correlations were calculated using the Spearman correlation test. All calculations were performed using GraphPad software version 5.00 and a difference or a correlation was considered significant when $p < 0.05$.

Results

Effects of IL-2, IL-7, IL-15 and RLI on bulk CD4⁺ and CD8⁺ T-cells

PBMC from 15 HIV⁺ patients with more than 500 CD4⁺ T-cells/mm³ (CD4HI group), 7 HIV⁺ patients with less than 200 CD4⁺ T-cells/mm³ (CD4LO group), and 9 HIV⁻ controls were labelled with CFSE, then cultured in the presence of IL-2, IL-7, IL-15 or the IL-15 agonist, RLI. On day 7, cells were harvested, stained for CD4 and CD8 expression, and the percentage of CD4⁺ and CD8⁺ cells that had undergone division was determined (Figure 1A-C). Initially, data were analyzed by Repeated Measures ANOVA, without considering the individuals' HIV serostatus. Compared to culture in the absence of cytokines, IL-2, IL-7, IL-15 and RLI all induced significant proliferation of CD8⁺ lymphocytes (Figure 1D), although the response to IL-2 was weaker than that observed with the other cytokines. CD4⁺ lymphocytes proliferated in response to IL-7 and to a lesser, though still statistically significant, extent in response to IL-15 and RLI. For each culture condition, the percentage of proliferating cells was then compared between patient groups. The response to IL-2 did not differ significantly between groups, either in CD4⁺ or CD8⁺ lymphocytes. Furthermore, proliferation in response to IL-7 was not significantly reduced in HIV⁺ patients, including those in the CD4LO group, compared to HIV⁻ controls. Proliferative responses of CD8⁺ T-cells in response to IL-15 or RLI were lower in patients from the CD4LO group compared to the CD4HI group ($p < 0.05$ by Student t-test), although this difference was not significant when the three groups were compared by ANOVA.

Proliferation of CD8⁺ lymphocytes in response to RLI was very similar to that seen with IL-15. To compare these cytokines in more detail, the proliferative responses of CD8⁺ lymphocytes to different concentrations of IL-15 and RLI was analyzed. At each

concentration, the response to RLI was significantly greater than that observed with IL-15 ($p < 0.05$ by paired t-test). However, the extent of this difference was small, corresponding to an EC₅₀ of 0.2nM for RLI compared to 0.35nM for IL-15 (Figure 2A). This minor difference was at least an order of magnitude smaller than that observed when the proliferative response of 32D β cells, which express only the IL-2/IL-15 $\beta\gamma$ receptor, was tested (Figure 2B). In cultures of PBMC from either HIV⁻ donors or HIV⁺ patients, RLI therefore showed only a modest increase in biological activity compared to native IL-15.

In a subset of patients (n=9 CD4HI and n=4 CD4LO) and controls (n=7) the effects of different cytokines on the level of apoptosis observed after 3 days of culture were compared (Figure 3). As expected, spontaneous apoptosis of CD4⁺ and CD8⁺ T-cells was greater in PBMC from HIV⁺ patients compared to HIV⁻ controls ($p < 0.005$ for CD8⁺ lymphocytes, and $p < 0.05$ for CD4⁺ lymphocytes by Student t-test). All of the cytokines tested reduced the levels of spontaneous apoptosis in CD4⁺ and CD8⁺ cells from HIV⁺ patients ($p < 0.05$ by ANOVA), with no significant differences between the four molecules. However, the level of apoptosis observed in CD8⁺ lymphocytes from HIV⁺ patients remained significantly greater than that seen in HIV⁻ controls after culture with IL-7 or IL-15 ($p < 0.05$ by Student t-test). Although these two cytokines did significantly inhibit apoptosis in CD8⁺ lymphocytes from HIV⁺ patients, this effect was not sufficient to reduce apoptosis to normal levels.

IL-7r expression and proliferative response in CD4⁺ T-cell subsets

We next analyzed the expression of the IL-7 receptor α -chain, CD127, and the proliferative response of CD4⁺ T-cell subsets in HIV⁺ patients compared to HIV⁻ controls. As shown in Figure 4A, CD127 expression was reduced in CD45RA⁻CD27⁻ CD4⁺ effector-memory (EM) cells from HIV⁺ patients, but not in CD45RA⁺CD27⁺ CD4⁺ naive (N) or

CD45RA⁻CD27⁺ CD4⁺ central memory (CM) cells. In the patients we studied, CD127 expression on CD4⁺_{EM} cells was not related to CD4⁺ T-cell count (Figure 4E) or viral load (not shown). However, the percentage of CD127⁺ cells among CD4⁺_N and CD4⁺_{CM} was strongly correlated to the CD4⁺ T-cell count, patients with low CD4⁺ counts having reduced CD127 expression in both CD4⁺_N and CD4⁺_{CM} subsets (Figure 4C, 4D). Because not all CD4⁺ subsets showed the same relationship between CD127 expression and disease progression, the correlation between CD127 on total CD4⁺ lymphocytes and CD4⁺ T-cell count, although discernible, was weak (Figure 4B).

In terms of functional responses to IL-7, the proliferation of CD4⁺_N and CD4⁺_{CM} cells from HIV⁺ patients was equivalent to that seen in HIV⁻ controls (Figure 5D, F). However, the proportion of CD4⁺_{EM} cells that divided in response to IL-7 was reduced from 20% in HIV⁻ controls to 5% in HIV⁺ patients (p=0.07, Figure 5E). Unlike IL-7, which stimulated proliferation of all CD4⁺ T-cell subsets, IL-15 and RLI specifically induced proliferation of CD4⁺_{EM} cells. Indeed, in HIV⁺ patients, but not HIV⁻ controls, the level of proliferation of CD4⁺_{EM} cells in response to IL-15 or RLI was greater than that observed in response to IL-7 (*not significant at the present time ...*).

Discussion

The main aim of this study was to evaluate the potential of the IL-15 agonist, RLI, as an immunotherapeutic agent for HIV infection, in comparison with IL-2, IL-7 and native IL-15. We found that RLI did not have markedly greater biological activity than native IL-15 in PBMC cultures, despite the fact that RLI was 100-fold more effective than IL-15 in functional tests using cells expressing only the IL-2/IL-15 $\beta\gamma$ receptor. Since PBMC cultures also contained monocytes and dendritic cells, it is likely that IL-15 α expression by these cells was involved in the functional responses to IL-15 that we observed. However, despite repeated attempts, we did not observe proliferation of purified T-cells either to IL-7, IL-15 or RLI (data not shown). We were therefore not able to confirm whether the proliferation of CD8⁺ and CD4⁺_{EM} T-cells in response to IL-15 was dependent on the presence of monocytes. In previous work we have shown that RLI is significantly more effective than native IL-15 *in vivo*, in both myelopenic (Huntington2009) and immunocompetent (Bessard2009) mice in a model of tumor immunotherapy. In the latter study, the enhanced antitumoral effect of RLI compared to native IL-15 was accompanied by a significantly greater biodisponibility of RLI. In the present *in vitro* study, concentrations of RLI and IL-15 available to PBMC were identical, and the finding that RLI was only marginally more effective than IL-15 under these conditions is consistent with the view that the superiority of RLI over IL-15 *in vivo* may be more related to its pharmacokinetic parameters than its enhanced affinity of RLI for the IL-2/IL-15 $\beta\gamma$ receptor.

We found that functional responses of bulk CD4⁺ and CD8⁺ T-cells to IL-7 were normal in HIV⁺ patients. Several groups have reported that both expression (Rethi2005)(Koesters2006) (Benito2008)(Zhang2009) of the IL-7 receptor α -chain, CD127, and functional responses (Bazdar2009)(Camargo2009)(Juffroy2010)(Colle2007) to IL-7 are

impaired in CD4⁺ and CD8⁺ T-cells from HIV⁺ patients. In order to reconcile our findings with these previously published data, we measured both CD127 expression and the proliferative response of CD4⁺ subpopulations.

Overall, we detected a significant reduction in CD127 expression and proliferative responses to IL-7 in CD4⁺_{EM} cells from HIV⁺ patients compared to HIV⁻ controls, but not in the CD4⁺_N and CD4⁺_{CM} subsets. With respect to CD127 expression, our results are consistent with some recent studies (Benito2008)(Juffroy2010) while other investigators have reported downregulation of CD127 expression either globally in CD4⁺ T-cells (Rethi2005)(Koesters2006)(Bazdar2009), or in both CD4⁺_{CM} and CD4⁺_{EM} subsets (Mercier2008). While methodological differences may be partly responsible for these discordant findings, differences in the patient groups studied is another important factor that must be taken into account, since several groups have noted that CD127 levels on CD4⁺ T-cells are correlated with CD4⁺ T-cell counts (Rethi2005)(Koesters2006)(Bazdar2009). Publications that reported a global reduction in CD127 expression by CD4⁺ T-cells studied patients with lower CD4⁺ counts than the present work, and this may be the main reason why we did not detect reduced expression of CD127 on most CD4⁺ T-cells in the HIV⁺ patients we studied.

As previously reported by Bazdar *et al.* (Bazdar2009), we found that CD127 expression in the CD4⁺_N and CD4⁺_{CM} subsets was strongly correlated with CD4⁺ T-cell counts, whereas the reduction in CD127 on CD4⁺_{EM} cells from HIV⁺ patients was independent of this parameter. Interestingly, in a longitudinal study, Benito and co-workers (Benito2008) found that the level of CD127 expression on CD4⁺_{EM} cells did not change significantly after 24 months of HAART, despite a median increase of more than 250 CD4⁺ T-cells/mm³, and despite the fact that CD127 expression on CD4⁺_{CM} cells increased significantly over the same period. Taken together, these results indicate that homeostasis of the CD4⁺_{EM} subset may be

more seriously perturbed earlier in infection, and may recover less fully after ART, compared to other CD4⁺ T-cell subsets.

In addition, we also found that CD4⁺_{EM} cells, but not CD4⁺_N and CD4⁺_{CM} cells, from viremic HIV⁺ patients with CD4⁺ T cell counts >500/mm³ showed reduced proliferation in response to IL-7. This finding, which is consistent with the levels of CD127 expression found on the different CD4⁺ T-cell subsets, explains why we did not detect an overall reduction in proliferation of bulk CD4⁺ T-cells in response to IL-7 from patients in the CD4HI group. Since CD4⁺_N and CD4⁺_{CM} cells constitute the majority of the total CD4⁺ lymphocytes, reduced proliferation in the CD4⁺_{EM} subset does not have a detectable impact on the proliferation of the total CD4⁺ lymphocyte population. However, we did not find evidence for reduced proliferation of CD4⁺ T-cells in patients with low CD4 counts, even though CD127 expression was reduced in all CD4⁺ T-cell subsets in these patients. This inconsistency in our data may be related to some of the methodological limitations of our study.

Firstly, proliferation in response to IL-7 was measured by a 7-day CFSE assay in the absence of exogenous antigen. We interpret the results of this assay as indicating the level of homeostatic proliferation in response to the added cytokines. However, there may be some contribution of antigen-specific proliferation over the course of the assay, either from presentation of bovine antigens derived from the serum used during the culture period, or from ongoing antigen-specific responses *in vivo*. This latter point is particularly important, since one would expect HIV-specific immune responses to be robust in the HIV⁺ patients we studied, as they were not receiving ART. Antigenic stimulation *in vivo* in HIV⁺ patients, but not controls, could therefore introduce a systematic bias tending to increase the proliferative responses observed in HIV⁺ patients. Secondly, the high intra-group variability of our results makes type II statistical error more likely, in particular when group size is small, as was the case with the CD4LO patient group (n=7). Since recruitment for this study was restricted to

patients with no current or previous antiretroviral therapy, it was not feasible to increase the sample size of the CD4LO group.

Finally, we found that both RLI and IL-15 efficiently stimulated the proliferation of CD4⁺_{EM} cells from HIV⁺ patients. IL-15 has previously been shown to support the homeostatic proliferation of CD4⁺_{EM} in mice (Purton2007), non-human primates (Picker2006), and in humans (Geginat2001). To the best of our knowledge, the present work is the first study of this function of IL-15 in HIV⁺ patients, although the responses of CD8⁺ lymphocytes from HIV⁺ patients to IL-15 have been extensively documented (Mueller2003)(White2007). It has previously been suggested that IL-15 may have therapeutic potential in the context of HIV infection, due to its ability to drive the proliferation of mucosal CD4⁺ T-cells in non-human primates (Picker2006). Because circulating CD4⁺_{EM} express CCR5, and are capable of migrating to mucosal sites, our observation that peripheral blood CD4⁺_{EM} cells from HIV⁺ patients respond to IL-15 is consistent with this view. Furthermore, the ability of IL-15 and RLI to specifically induce proliferation of CD4⁺_{EM} cells is particularly interesting, since this T-cell subset showed the most severe alterations in both CD127 expression, and proliferation in response to IL-7 in HIV⁺ patients. Furthermore, recent clinical experience with IL-7 has shown that CD4⁺_{CM} and CD4⁺_N cells, rather than CD4⁺_{EM} cells, are preferentially increased by IL-7 therapy. (Sereti2009)(Levy2009).

However, since CD4⁺_{EM} cells represent one of the major target cell populations for HIV replication, expanding their numbers would run the risk of increasing viral replication. Indeed, in the macaque-SIV model, administration of IL-15 during acute SIV infection increased setpoint viral load and accelerated disease progression (Mueller2008). Further work indicated that this was due to upregulation of CD4 expression by IL-15 that increased the susceptibility of macaque CD4⁺_{EM} cells to SIV infection (Eberly2009). Therefore, although the combination of IL-15 immunotherapy with ART might accelerate reconstitution of the CD4⁺_{EM} subset,

including mucosal effector cells, in HIV⁺ patients, it is unclear whether the potential benefit of such a therapy would outweigh the risk involved.

Acknowledgments

This study was supported by a research grant from SIDACTION. Y.P. was the recipient of a scholarship awarded by the Région des Pays de la Loire. The authors would like to thank Dr Lisa Chakrabarti for useful comments on the manuscript. Finally, we would particularly like to thank the patients who agreed to participate in this study.

Tables

Table 1 Clinical and biological parameters of HIV⁺ patients.

Median values are shown with the range of values in parenthesis.

	CD4 LO	CD4 HI	
n	7	22	
VL (Log copies/ml)	5,5 (3,23-5,95)	4,3 (2,5-5,8)	0,3
CD4 (cells/mm ³)	149 (15-423)	593 (489-1018)	<<0,001
Nadir	71(15-401)	506(329-925)	<<0,001
Age	41 (27-57)	36 (25-60)	0,1

Figure 1 Homeostatic proliferation induced by different cytokines

PBMC were labeled with CFSE, cultured with either 1nM IL-2, IL-7, IL-15 or RLI or without added cytokines, as indicated, and cell division was assessed by the dilution of CFSE at day 7. Panels A)-C) show an example of the analysis from one HIV⁺ patient, and panels D) and E) show the combined results for all samples analyzed.

A) Lymphocyte gating by forward and side scatter.

B) Gating of CD8⁺ and CD4⁺ lymphocytes.

C) CFSE fluorescence in the CD4⁺ and CD8⁺ lymphocyte populations under different culture conditions.

Percentage of D) CD8⁺ and E) CD4⁺ lymphocytes that had divided during culture. n=9 HIV⁻ donors (□), n=15 CD4HI HIV⁺ patients (▲), and n=7 CD4LO HIV⁺ patients (◆)

Medians for each group are represented by a bar (-).

Figure 2 Dose-response relationships for IL-15 and RLI in patient CD8⁺ lymphocytes and 32Dβ cells

A) Percentage of HIV⁺ patient CD8⁺ lymphocytes (n=22, 15 CD4HI and 7 CD4LO patients) that had divided in response to different concentrations of IL-15 (Δ) or RLI (■). Symbols show median values, and error bars indicate the upper and lower quartiles.

B) Percentage of 32Dβ cells that had divided in response to different concentrations of IL-15 (Δ) or RLI (■). The results of one experiment are shown.

Figure 3 Inhibition of spontaneous apoptosis by different cytokines

Fresh PBMC were cultured with either 1nM IL-2, IL-7, IL-15 or RLI or without added cytokines, as indicated. After 3 days, cells were harvested and stained with CD8, CD4 and Annexin-V. Panels A)-C) show the results from one HIV⁺ patient, and panels D) and E) show the combined results for all samples analyzed.

A) Lymphocyte gating by forward and side scatter.

B) Gating of CD8⁺ and CD4⁺ lymphocytes.

C) Annexin-V staining on CD8⁺ or CD4⁺ lymphocytes under different culture conditions.

Percentage of Annexin-V⁺ D) CD8⁺ and E) CD4⁺ lymphocytes from 7 HIV⁻ donors (□) and 13 HIV⁺ patients (▲); n=9 CD4HI, and n=4 CD4LO. Medians for each group are represented by a bar (-)

Figure 4: CD127 Expression on CD4⁺ T Cell subsets

1. Cryopreserved PBMC were stained with for CD4, CD45RA, CD27 and CD127. The percentage of CD127⁺ cells was measured in the CD4⁺_N (CD45RA⁺CD27⁺) CD4⁺_{CM} (CD45RA⁻CD27⁺) and CD4⁺_{EM} (CD45RA⁻CD27⁻) subsets.

2. A) CD127 expression on CD4⁺_N, CD4⁺_{CM}, and CD4⁺_{EM}, subsets from 13 HIV⁻ donors (□) and 23 HIV⁺ patients (▲); n=19 CD4HI, n=4 CD4LO.

B-E) Correlation between CD4⁺ T-cell counts and CD127 expression in different CD4⁺ lymphocyte subsets.

Figure 5: Homestatic proliferation of different CD4⁺ subsets in response to cytokines

PBMC were labeled with CFSE, cultured with either 1nM IL-2, IL-7, IL-15 or RLI or without added cytokines, as indicated, and cell division was assessed by the dilution of CFSE at day 7. Panels A)-D) show an example of the analysis from one HIV⁺ patient, and panels G-I) show the combined results for 8 HIV⁻ donors (□) and 11 HIV⁺ CD4HI patients (▲).

A) Lymphocyte gating by forward and side scatter.

B) Identification of CD4⁺ lymphocytes.

C) Characterization of CD4⁺ cell naive, EM and CM subsets.

D) CFSE fluorescence in different CD4⁺ lymphocyte subsets populations under different culture conditions.

Percentage of E) CD4⁺_N F) CD4⁺_{CM} and G) CD4⁺_{EM} cells that had divided during culture.

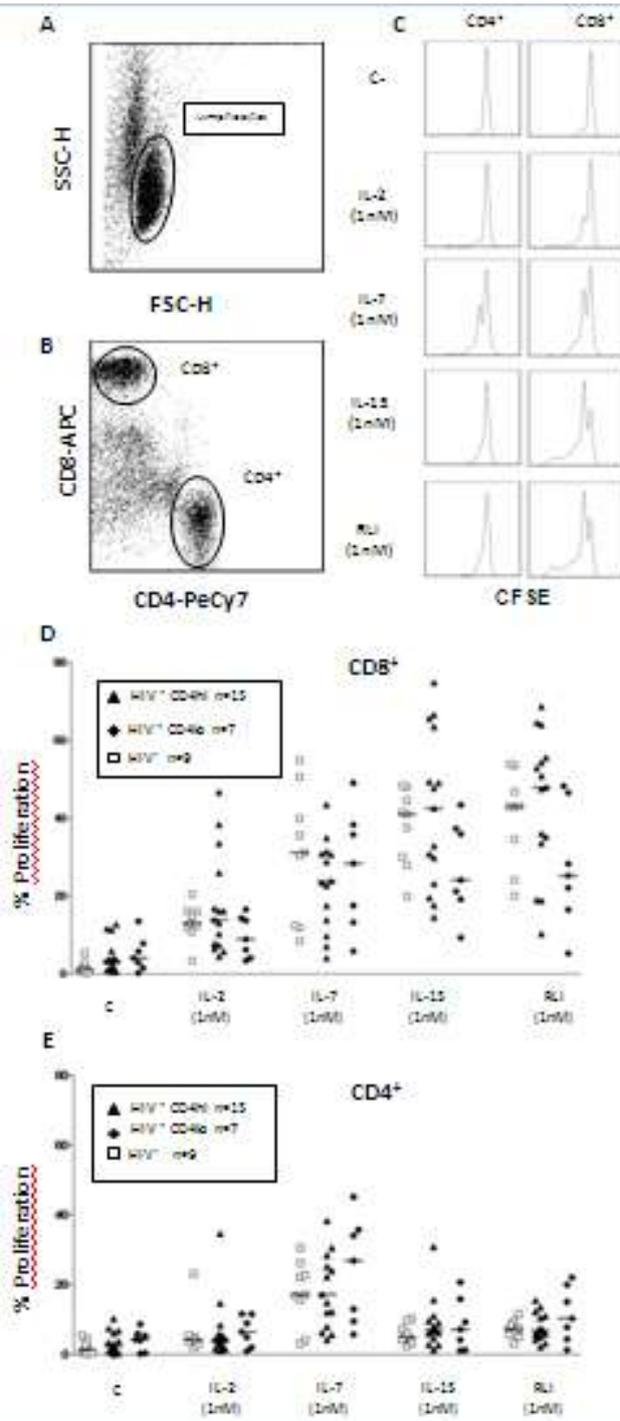


Figure 1

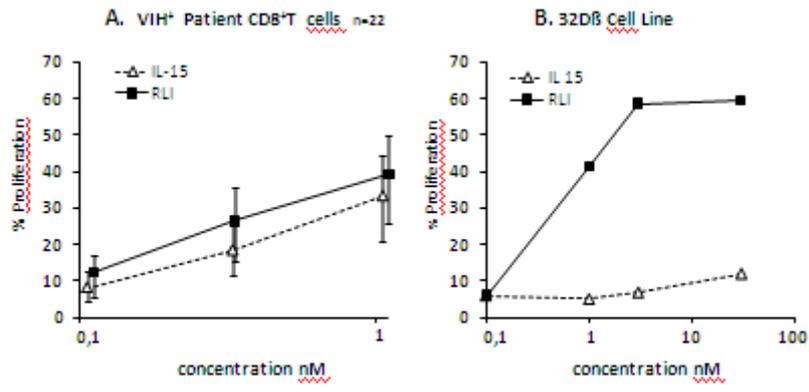


Figure 2

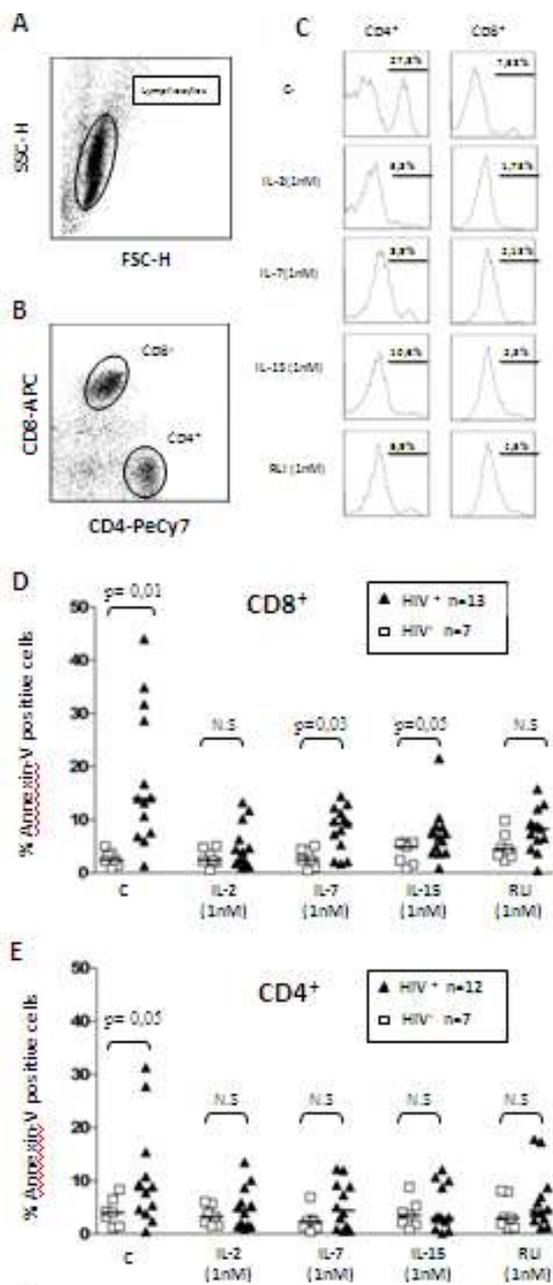


Figure 3

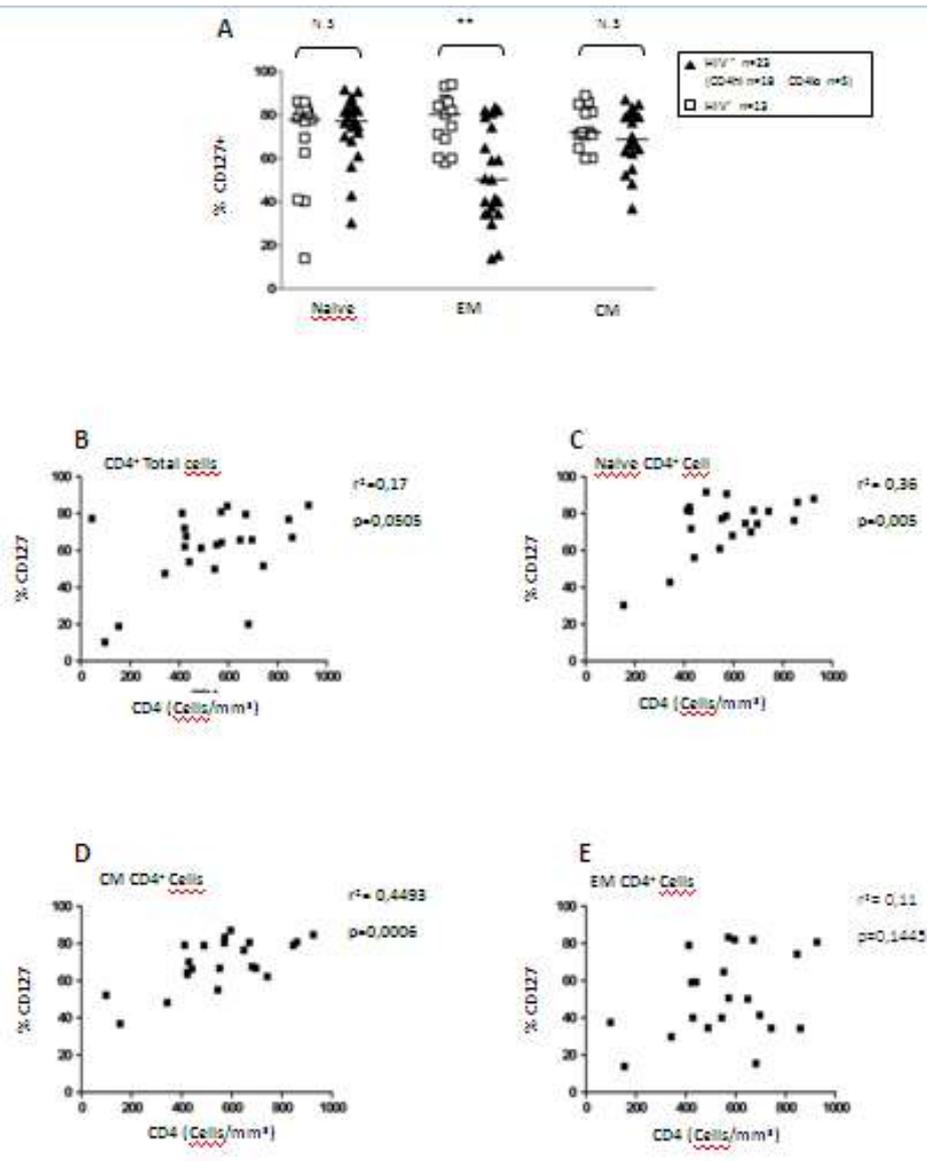


Figure 4

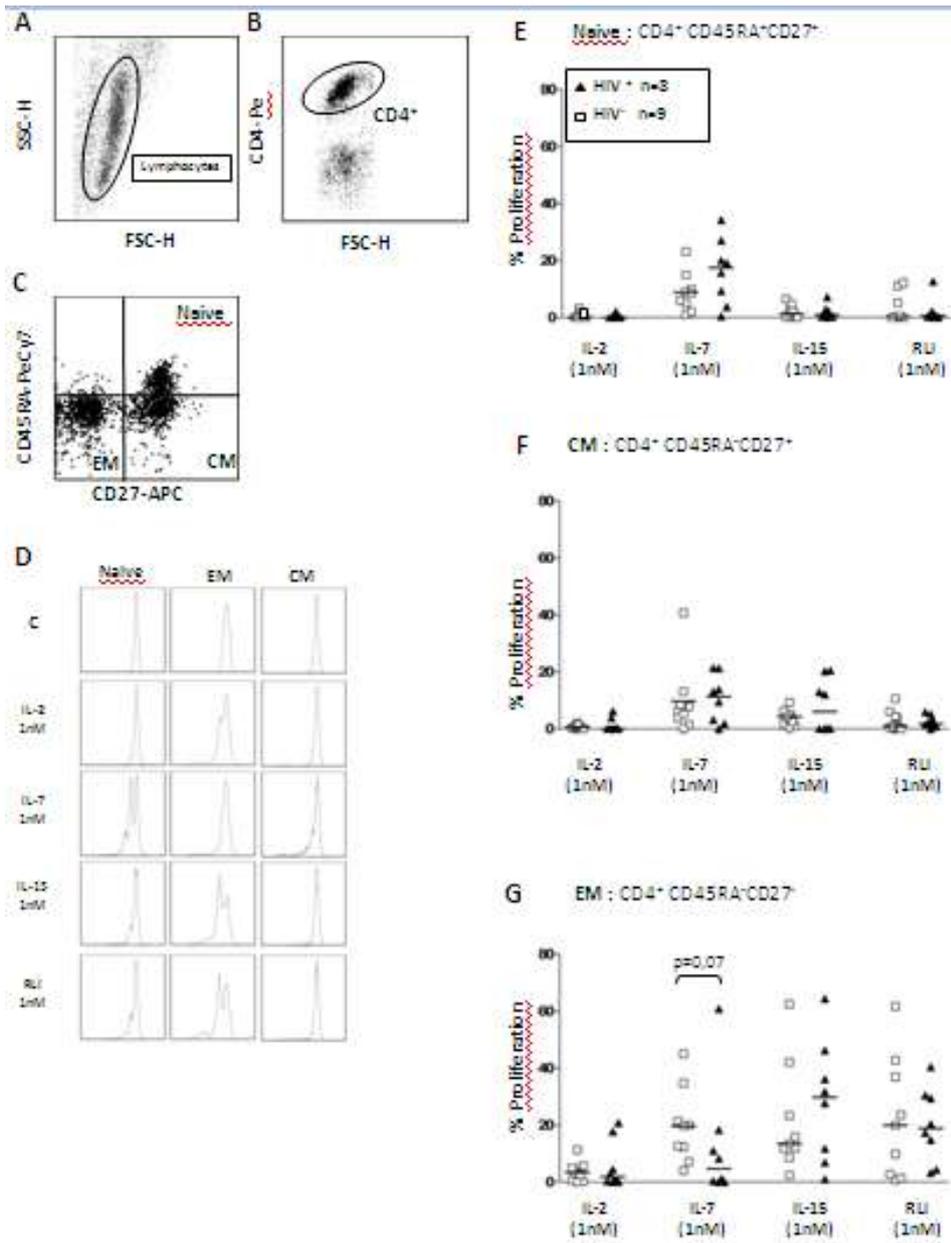


Figure 5

Réponse immune cellulaire et thérapie de l'infection par le VIH.

Pendant le traitement antirétroviral de l'infection par le VIH, différents cas d'échecs thérapeutiques peuvent survenir, dans ce travail nous nous sommes intéressés à deux aspects de cet échec:

D'une part la grande variabilité du VIH permet au virus d'échapper aux médicaments antirétroviraux et peut être à l'origine **d'un échec virologique**. Il a été observé que plusieurs **mutations de résistances** sont localisées au sein des épitopes reconnus par les CTL, suggérant que la réponse immune peut avoir un effet sur les virus résistants. Afin d'étudier cette question, nous avons évalué, la réponse cytotoxique dirigée contre l'épitope RT181-189 chez 34 patients HLA-A2⁺ séropositif pour le VIH. Cet épitope comprend la mutation **M184V**, responsable de la résistance virale à la Lamivudine. Chez la majorité des patients en échec virologique sous Lamivudine la réponse contre cet épitope n'est pas présente alors qu'elle est fréquente chez les patients naïfs de traitement. Une étude détaillée sur les facteurs influençant le développement de la réponse à cet épitope a été effectuée.

Par ailleurs, chez certains patients la reconstitution du compartiment CD4 n'est pas complète, **il s'agit d'un échec immunologique**. Dans ce cadre nous avons comparé les effets de trois cytokines (IL-2, IL-7, IL-15) et d'un agoniste de l'IL-15 RLI, sur les CD4⁺ et CD8⁺ des patients pour évaluer leur possible rôle thérapeutique dans la reconstitution de l'immunocompétence. Nos résultats montrent que la réponse proliférative des patients à l'IL-7 est préservée chez les patients VIH⁺ même chez ceux dont le taux de CD4 est faible. L'IL-15 et le RLI induisent une prolifération efficace de la population CD4 effecteur mémoire.

Mots Clés : Échec virologique, Mutation de résistance, Réponse cytotoxique, Échec immunologique, cytokines.

Cellular immune response and treatment in HIV infection

During HIV infection antiretroviral tritherapy efficiently inhibits viral replication and restores CD4 counts in infected patients. Nevertheless treatment failure may occur. In this work, we investigated two different aspects of this problem:

Firstly, HIV sequence variability may provoke the emergence of resistant viruses leading to **virological failure**. The fact that many drug resistance mutations in HIV fall within CTL epitopes suggests that the immune response play a role in inhibiting resistant virus. In order to address this question we analyzed the response against the RT181-189 epitope covering the Lamivudine resistance mutation, M184V in 34 HLA-A2+ HIV+ infected patients. We found that RT181-189 is frequently recognized by ART Naive patients and poorly recognized by patients with virological failure under Lamivudine treatment. Both viral load and viral sequence polymorphism were associated with the presence of a CTL response against RT181-189.

Secondly, some patients may undergo **immunological failure**; the recovery of CD4⁺ T-cell counts is incomplete despite complete suppression of viral replication. The aim of our study was to compare the effects of IL-2, IL-7, IL-15 and an agonist of IL-15, RLI, on CD4⁺ and CD8⁺ lymphocytes from HIV-infected patients, in order to evaluate the therapeutic potential of these molecules on immune reconstitution. Overall our results indicate that the proliferative response of CD4⁺ T-cells to IL-7 is preserved, even in patients with low CD4⁺ T-cell counts, and that both IL-15 and RLI can induce homeostatic proliferation of CD4⁺ effector-memory T-cells. In, RLI did not show greatly increased potency compared to native IL-15.

Key world: Virological failure, Resistance mutations, Eptiope; CTL, immunological failure, cytokines