



HAL
open science

Etude pré-clinique d'une stratégie de thérapie génique de l'infection par le VIH combinant l'expression de deux inhibiteurs d'entrée

Nicolas Petit

► **To cite this version:**

Nicolas Petit. Etude pré-clinique d'une stratégie de thérapie génique de l'infection par le VIH combinant l'expression de deux inhibiteurs d'entrée. Virologie. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2014. Français. NNT : 2014PA066557 . tel-01374741

HAL Id: tel-01374741

<https://theses.hal.science/tel-01374741>

Submitted on 1 Oct 2016

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Université Pierre et Marie Curie

Ecole doctorale

Physiologie et Physiopathologie

Centre d'Immunologie et
des Maladies Infectieuses de Paris (CIMI)

Etude pré-clinique d'une stratégie de thérapie génique de l'infection par le VIH combinant l'expression de deux inhibiteurs d'entrée

Présentée par

Nicolas PETIT

Thèse de doctorat de Physiologie, Physiopathologie et thérapeutique

Spécialité: Thérapie génique

Dirigée par le Dr Gilles MARODON

Présentée et soutenue publiquement le 30/09/2014

Devant un jury composé de :

Mr LEMOINE François, Professeur : Président

Mme GALY Anne, Directeur de recherche : Rapporteur

Mr LELIEVRE Jean Daniel, Professeur : Rapporteur

Mme ANDRE-SCHMUTZ Isabelle, Directeur de recherche : Examineur

Mr CORDELIER Pierre, Directeur de recherche : Examineur

Mr MARODON Gilles, Chargé de recherche : Directeur de thèse

L'échec est le fondement de la réussite.

Lao-Tseu

Remerciements

Je souhaite tout d'abord adresser mes remerciements les plus sincères aux membres du jury :

Au Dr Anne Galy ainsi qu'au professeur Jean-Daniel Lelièvre pour avoir accepté d'être les rapporteurs de ma thèse et pour leurs précieuses remarques qui m'ont permis d'améliorer la qualité de mon manuscrit.

Au Dr Isabelle André-Schmutz ainsi qu'au Dr Pierre Cordelier d'avoir accepté d'être examinateurs de ces travaux de thèse.

Et au Pr François Lemoine pour me faire l'honneur de présider ce jury.

Je souhaiterais remercier le Pr David Klatzmann pour m'avoir accueilli dans son laboratoire.

Je tiens à remercier le Dr Gilles Marodon pour m'avoir donné l'opportunité de réaliser une thèse sur une thématique passionnante. Je lui suis reconnaissant pour son investissement au quotidien et pour m'avoir guidé vers une autonomie dans mes réflexions scientifiques tout au long de ma thèse.

Il y a un certain nombre de personnes sans lesquelles ces travaux n'auraient pas pu aboutir : je pense à Béatrice pour son aide précieuse en biologie moléculaire, Karim et Guy pour avoir développé l'intrakine P2, ainsi que les services de virologie des hôpitaux la Pitié Salpêtrière et de Tenon pour l'ensemble des charges virales qu'ils ont réalisé.

Une thèse c'est également de belles rencontres humaines et je pense tout particulièrement aux membres du laboratoire: Rachel et sa recette de gâteau de citron, Fabien et Charlotte avec nos 4 heures de jeux, Thomas l'homme-orchestre (Hoé-Hoé) et ses bonjours très particuliers, Emilie et son rire, me donnant l'impression d'être drôle, Tristan et nos vacances de pêche, bien qu'on n'en parlera pas ..., Gwladys et son efficacité à maintenir le P2 en ordre, Audrey pour sa gentillesse, Juliette :« je suis Byoncé moi ma gueule » et tous les autres que je n'ai pas cité.

Je tiens à remercier plus particulièrement :

Mr Claude Baillou pour ses conseils techniques précieux, sa collaboration au projet et son humour qui m'a permis de conserver une bonne humeur dans des moments stressants. Claude je te confie également le cheptel, je sais que tu en prendras grand soin.

Aude alias Bubusulfan, pour son acharnement à m'enseigner les couleurs, pour son aide au quotidien autant dans les manips que pour ses conseils achats/modes. Pour nos pauses, quelquefois démotivantes et pour tous les excellents souvenirs que j'emporterai avec moi, comme les Rainbow Cupcakes.

Mes parents pour leur soutien moral et financier durant toutes ces années, sans lesquels je n'aurais jamais pu réaliser cette thèse. Je remercie également, Marie, ma compagne pour son soutien inestimable au quotidien et pour les sacrifices personnels et professionnels qu'elle a acceptés de faire en m'accompagnant sur Paris.

Table des abréviations

AAV	virus adéno associés	LTR	Long Terminal Repeat
Ac	Anticorps	LV	Lentivirus
ACD	acid citrate dextrose	Ma	Matrice
Ad	Adenovirus	MALT	Tissus lymphoïde associé aux muqueuses
ADN	Acide Désoxyribo Nucléique	MLV	Virus de la leucémie murine
ANRS	Agence Nationale de Recherche contre le Sida	MO	Moelle osseuse
ARN	Acide RiboNucléique	NC	Nucléocapside
ART	Antiretroviral therapy	Nef	Negative regulatory factor
ARV	Anti rétroviraux	NK	Natural killer
BLT	Bone Liver Thymus	NLS	Signaux de localisation nucléaire
BLV	Virus de la leucémie bovine	OMS	Organisation mondiale de la santé
Ca	Capside	PBMC	Peripheral blood mononuclear cell
CD	Cluster de différenciation	PBS	Primer Binding Site
CEF	Centre d'expérimentation fonctionnelle	PBS	Phosphate Buffer Saline
CMH I	Complexe Majeur d'Histocompatibilité I	PE	Phycoérythrine
CNS	Système nerveux central	PGK	Phosphoglycerase kinase
cPPT	Central polypurine tracts	PIC	Complexe de préintégration
CSHh	Cellules Souches Hématopoïétiques humaines	PNH	Primate non humain
DAMPs	motifs moléculaires associés au danger	Pol	Polimérase
DC	Cellules dendritiques	Pr	Protéase
dNTP	désoxynucléotide tri phosphate	PS	peptide signal
EBV	Epstein-Barr Virus	RCL	Replication competent lentivirus
EF1- α	Facteur d'élongation 1 α	RE	Reticulum Endoplasmique
ESCRT	Endosomal sorting complexes required for transport	Rev	Regulator of Expression of Virion
FA	Formaldehyde	RRE	Rev response element
FIV	Virus de l'immunodéficience féline	RSV	Rirus du sarcome de rous
FLV	Virus de la leucémie féline	RT	Rétrotranscriptase
FMO	Fluorescence minus one	RTC	Complexe de RétroTranscription
FV	Foamy vector/virus	SC	Sequence charnière
GALT	Gut associated lymphoid tissue	SCID	Severe Combined Immunodeficiency Disease
GFP	Green fluorescent protein	SEM	Sequence d'ancrage à la membrane
GVHD	Graft versus host disease	SIDA	Syndôme de l'Immunodéficience Acquise
HBV	Virus de l'hépatite b	SIN	Self inactivating
hCMV	Cytomegalovirus humain	SIRP α	Signal Regulatory Protein alpha
HCV	Virus de l'hépatite c	Tat	Trans-Activator of Transcription
HLA	Human Leucocyte Antigène	TLR	Tool like receptor
HTLV-I	Virus lymphotrope humain de type I	TNF α	Facteur de nécrose tumorale alpha
IBD	Intégrase Binding Site	Vif	Viral infectivity factor
IFN γ	interferon γ	VIH	Virus de l'Immunodéficience humaine
IgM	Immunoglobuline	VIS	Virus de l'Immunodéficience Simienne
IL	Interleukine	VIRIP	Virus inhibitor peptide
IN	Intégrase	Vpr	Viral protein R
INNTI	Inhibiteur non nucléosidique de rétrotranscriptase	Vpu	Viral protein U
INTI	Inhibiteur nucléosidique de transcriptase inverse	VSV-G	Virus de la stomatite vésiculaire glycoprotéine
LC	Cellules de Langerans	WPRES	woodchuck hepatitis post-transcriptional regulatory element

LEGDF Lens Epithelium-derived Growth factor
LPS Liposaccharide

ZFN Nuclease aux doigts de zinc

Sommaire

Introduction.....	8
Chapitre I : Le virus de l'immunodéficience humaine.....	8
1 Généralités sur le VIH.....	8
2 Tropisme du VIH.....	8
3 Les cellules cibles du virus.....	9
4 Génome du VIH.....	10
5 Cycle de réplication du virus.....	12
5.1 Entrée du virus dans la cellule cible.....	12
5.2 Evénement de pré-intégration.....	13
5.2.1 Rétrotranscription.....	13
5.2.2 Transfert du matériel génétique viral dans le noyau.....	14
5.3 Intégration et événement post-intégration.....	14
5.3.1 Intégration.....	14
5.3.2 Production des protéines virales.....	16
5.3.3 Formation des virions.....	17
5.3.4 Facteurs de restrictions cellulaires.....	17
6 Physiopathologie de l'infection par le VIH.....	18
6.1 Infection par le VIH et évolution de la maladie.....	18
6.2 Les réservoirs viraux.....	20
6.3 Mécanismes impliqués dans la délétion des lymphocytes T CD4.....	23
7 Les antirétroviraux.....	24
7.1 Bénéfices et effets indésirables des traitements antirétroviraux.....	24
7.2 Les différentes classes d'antirétroviraux.....	25
7.3 Emergence de résistance au ARV.....	26
Chapitre II : Prophylaxies et thérapies anti-VIH.....	28
1 Modèles animaux pour l'étude du VIH.....	28
1.1 Primate.....	28
1.2 Les petits modèles animaux.....	31
1.2.1 Développement des souris immunodéficientes.....	32
1.2.2 Souris humanisées et physiopathologie du VIH dans ces modèles.....	34
1.2.2.1 Humanisation par transfert adoptif de lymphocytes T.....	35
1.2.2.2 Humanisation par greffe de cellules souches humaines.....	35
1.2.2.3 Humanisation par greffe de cellules souches humaines associée à des tissus humains.....	36
1.2.3 Optimisation des souris humanisées par insertion de gènes humains.....	37
1.2.3.1 Insertion des gènes HLA humains.....	38
1.2.3.2 Insertion des gènes de cytokines humaines.....	38
2 La vaccination VIH.....	39
2.1 Etat des lieux des essais cliniques de phase IIb et III.....	39
2.2 L'essai RV144.....	40
2.3 Les futures stratégies vaccinales.....	42
3 Thérapie cellulaire du VIH, le patient de Berlin.....	42
4 Thérapie génique.....	44
4.1 Généralités.....	44
4.2 Thérapie génique de l'infection par le VIH.....	45
4.2.1 Les vecteurs de transfert de gènes.....	45
4.2.1.1 Adénovirus.....	46
4.2.1.2 Virus adéno-associés (AAV).....	46
4.2.1.3 Rétroviridae.....	46
4.2.1.3.a Spumavirus.....	47

4.2.1.3.b	Oncorétrovirus	47
4.2.1.3.c	Lentivirus	48
4.2.2	Cibles thérapeutiques	50
4.2.2.1	La fusion	50
4.2.2.2	La décapsulation, la pré-intégration et la post-intégration	53
4.2.2.3	L'intégration	55
4.2.2.4	La transcription du provirus	55
4.2.2.5	Thérapies immuno-géniques	56
4.2.3	Etat des lieux des stratégies de thérapies géniques réalisés <i>in vivo</i>	57
4.2.4	Etat des lieux des essais cliniques de thérapies géniques de l'infection par VIH	60
4.2.5	Stratégie d'inhibition d'entrée développée au sein de l'équipe	63
4.2.5.1	Le peptide C46	63
4.2.5.2	L'intrakine P2	65
4.2.5.3	Combinaison de deux transgènes anti VIH	65
4.2.5.4	Modèle murin	66
4.2.5.5	Objectifs de la thèse	67
Rationnel.....		68
Résultats		70
Article 1: The dynamic of HIV replication is partly independent of the immune response in humanized NOD.SCID. α γ c-/- mice (article non soumis).		70
Article 2: Targeting both viral and host determinants of HIV entry using a new lentiviral vector co-expressing the T20 fusion inhibitor and a selective CCL5 intrakine (Article accepté en juillet 2014).		98
Article 3 : La combinaison d'inhibiteur l'entrée du VIH dans un vecteur lentiviral, prévient <i>in vivo</i> la délétion des lymphocytes T CD4 (article non soumis).....		108
1	Résumé	108
2	Résultats.....	108
2.1	Validation du vecteur tricistronique	108
2.2	Avantage sélectif des cellules transduites et charge virale.....	110
2.3	Protection contre la délétion des lymphocytes T CD4 ⁺ transduits.....	111
3	Discussion	112
4	Légende des figures	114
5	Figures.....	117
6	Matériels et Méthodes	122
Discussion et perspectives		126
Etat de l'art		126
Stratégies de thérapies géniques ciblant l'entrée dans le modèle des souris humanisées		127
1	Avantage sélectif des cellules modifiées.....	127
2	Protection contre la délétion des CD4 ⁺	129
3	Effet sur la charge virale	131
Autres stratégies dans le modèle des souris humanisées		132
Cibler l'entrée du virus est-elle réellement la stratégie la plus efficace ?		134
L'intérêt des stratégies combinées		134
Moduler l'expression de CCR5 présente-t-il un risque ?		135
Dynamique de la délétion des lymphocytes T CD4 ⁺ CCR5 ⁺ <i>in vivo</i>		136
Dynamique et évolution virale.....		137
Amélioration de notre stratégie.....		137
1	Virus Inhibitor Peptide (VIRIP)	138

2	Autres transgènes	138
3	Vecteur mobilisable	138
Les perspectives cliniques.....		142
1	Transfert de gènes dans les LT	142
2	Transfert de gènes dans les CSH	143
3	Risques associés à une réponse immune.....	144
Références Bibliographiques		146
Annexe : Liste des publications scientifiques et présentations orales.....		167
1	Publications scientifiques.....	167
2	Présentations orales	167
Table des illustrations		168

Introduction

Chapitre I : Le virus de l'immunodéficience humaine

1 Généralités sur le VIH

Le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) est responsable d'une des plus grandes pandémies de la fin du XX^e siècle. En 2012, on comptait près de 2,3 millions de nouvelles infections et 35,3 millions de personnes vivant avec le virus dans le monde (UNAIDS, 2013). Ce virus identifié par l'équipe du Professeur Montagnier en 1983, possède un tropisme particulier pour les lymphocytes T CD4 (Klatzmann et al., 1984) et est responsable du Syndrome de l'ImmunoDéficience Acquis (SIDA) (Barré-Sinoussi et al., 1983). L'origine de ce virus est maintenant clairement établie, comme étant issue d'une transmission du virus de l'immunodéficience simienne (VIS) du singe à l'Homme. Le VIS_{cpz} porté par les chimpanzés et le VIS_{sm} porté par les singes Mangabeys, ont pu évoluer chez l'Homme et ainsi créer deux nouveaux virus, respectivement le VIH-1 et le VIH-2 (Gao et al., 1999), (Chen et al., 1997). L'explication la plus probable concernant cette transmission inter espèce est une contamination lors de la préparation de la viande de singe pour la consommation humaine.

Le VIH comme le VIS appartient au genre Lentivirus de la famille des Retroviridae caractérisé par la présence d'une rétrotranscriptase permettant la synthèse de l'ADN viral à partir d'un brin d'ARN. C'est un virus enveloppé d'une bicouche phospholipidique portant des glycoprotéines impliquées dans les mécanismes d'infection et dans le tropisme du virus

2 Tropisme du VIH

Le tropisme du VIH est défini par les glycoprotéines qui en interagissant avec des récepteurs cellulaires vont permettre l'entrée du virus dans la cellule cible. La molécule CD4 a été identifiée comme le récepteur principal du virus en 1984 (Klatzmann et al. 1984), alors que les corécepteurs CCR5 et CXCR4 ont été identifiés beaucoup plus tardivement en 1996 (Feng, Broder, Kennedy, & Berger, 1996) (Dragic, Litwin, Allaway, & Martin, 1996) (Deng et al. 1996). L'interaction de la glycoprotéine virale gp120, avec la molécule CD4 va induire un changement de conformation permettant à la boucle V3 de gp120 de se fixer sur le corécepteur. Cette boucle V3 est une région hypervariable ayant la possibilité de se lier soit

avec le corécepteur CCR5 (CD195), soit avec le corécepteur CXCR4 (CD184) définissant ainsi le tropisme R5 ou X4 du virus (Shioda et al. 1991). La physiopathologie des souches R5 et X4 diffère également. En effet, les souches à tropisme R5 sont majoritairement retrouvées chez les patients lors de la primo-infection ainsi que durant la phase asymptomatique, alors que les souches X4, quant à elles émergent plus tardivement et sont associées avec une progression vers un stade SIDA (Schuitemaker & Koot, 1992). Les mécanismes dictant le switch de tropisme restent en grande partie non élucidés. Les transmissions par voie sexuelle représentent la majorité des nouvelles infections et les muqueuses vaginales et anales sont riches en cellules exprimant les molécules CD4 et CCR5 comme les cellules de Langerhans (LC), les cellules dendritiques (DC) et les macrophages (Granelli-Piperno, Delgado, Finkel, Paxton, & Steinman, 1998) (Patterson et al. 1998). Ces cellules présentant un fort niveau de CCR5 capteraient donc préférentiellement les virus à tropisme R5. Une étude a également montré l'implication de cellules épithéliales au niveau des muqueuses vaginales qui pourraient capter et transférer les virus R5 vers les LC et les DC présentes dans les muqueuses (Meng et al., 2002).

Le corécepteur CCR5 joue un rôle essentiel dans les mécanismes de transmission du virus. Ce rôle a été initialement mis en évidence chez des individus non-infectés par le VIH malgré une forte exposition au virus. Ces derniers portaient une délétion de 32 paires de bases dans le gène CCR5 ($\Delta 32$) aboutissant à la dégradation de la protéine non fonctionnelle (Liu, Paxton, Choe, & Ceradini, 1996). La fréquence de la délétion $\Delta 32$ à l'état homozygote représente seulement 1% de la population de l'Europe de l'Est et environ 20% à l'état hétérozygote (Liu et al., 1996).

3 Les cellules cibles du virus

Les trois principaux types cellulaires infectés par le virus au sein du système immunitaire sont les lymphocytes T CD4, les monocytes/macrophages et les cellules dendritiques. Il existe plusieurs sous populations cellulaires au sein des lymphocytes T CD4 et deux populations jouent un rôle majeur. Schématiquement, les lymphocytes T CD4 mémoire/activés, sont les principales cellules productrices du virus et les lymphocytes T CD4 mémoire/quiescents, sont des cellules dites "réservoirs" dans lesquelles le virus est intégré mais non exprimé. L'activation de ces cellules entraînera la sortie de l'état latent du virus et par conséquent induira sa production (Chun et al. 1997). Les monocytes se différencient en macrophage lorsqu'ils arrivent sur le site de l'inflammation, ils phagocytent ensuite les agents pathogènes et sécrètent des cytokines pro-inflammatoires permettant le recrutement d'autres

cellules de l'immunité (Shi et al. 2011). Les cellules microgliales, elles aussi dérivées des monocytes permettent le transfert du VIH dans le système nerveux central (CNS). Ces cellules expriment également les récepteurs CD4 et CCR5 et sont susceptibles à l'infection par le VIH. De plus, elles participent à la diffusion du virus dans l'organisme et jouent également un rôle de réservoir (Kumar et al. 2014). Les DC, comme les macrophages, sont des cellules phagocytaires et spécialisées dans la présentation des antigènes aux lymphocytes T. Elles jouent un rôle majeur dans l'infection par le VIH, car très présentes dans les muqueuses, elles sont les premières cellules infectées et participent à la diffusion du virus R5 (Zaitseva et al. 1997). La transmission du virus aux lymphocytes T CD4 peut avoir lieu par deux mécanismes différents. Le premier est l'infection directe (cis-infection), les DC infectées produisent du virus infectieux qui va à son tour infecter les lymphocytes (Cameron et al., 1992). Le second mécanisme n'implique pas les récepteurs classiques puisque le virus est capté par le récepteur DC-SIGN à la surface des DC, internalisé dans un endosome précoce puis transféré à un lymphocyte T CD4 (Kwon, Gregorio, Bitton, Hendrickson, & Littman, 2002). Ce dernier mécanisme dit de trans-infection n'implique pas une infection productive des DC (fig. 1).

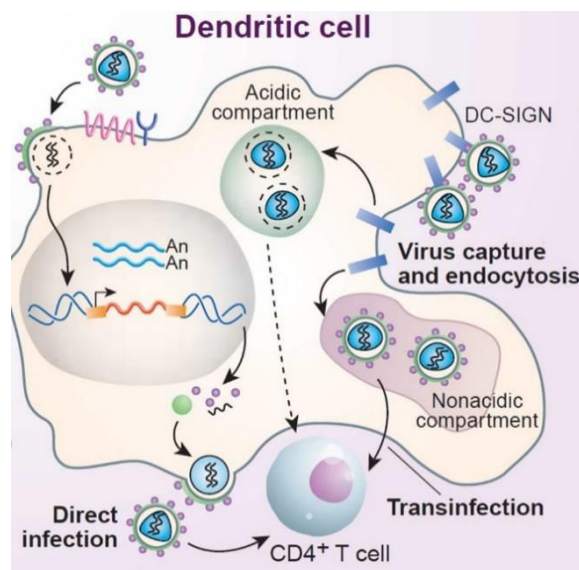


Figure 1 : Mécanisme de Cis- et Trans- infection du VIH par les DC. Extrait de Stevenon M. Nat Med 2003

4 Génome du VIH

La capside du VIH renferme deux copies d'ARN simple brin à polarité positive d'environ 9 kb. Son génome contient neuf gènes, regroupant les trois gènes principaux des

rétrovirus (*gag*, *pol* et *env*) indispensables pour la synthèse des protéines virales. Il contient également quatre gènes codant pour des protéines accessoires (*nef*, *vpr*, *vpu* et *vif*) et deux gènes codant pour des protéines dites régulatrices (*tat* et *rev*). Les protéines accessoires et régulatrices interviennent dans le cycle viral. Le génome viral est encadré par deux séquences répétées appelées Long Terminal Repeat (LTR) (fig. 2) et tableau 1.

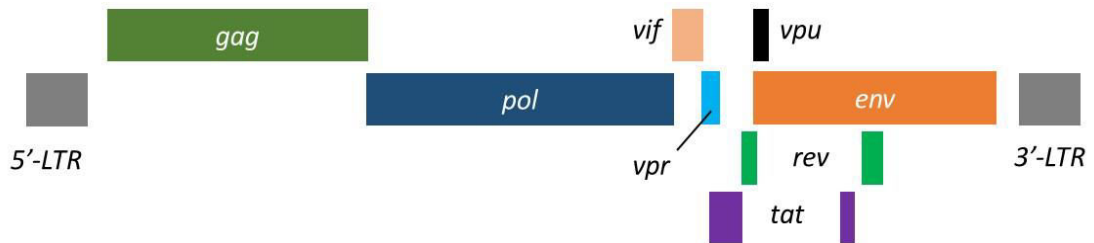


Figure 2 : Représentation schématique du génome du VIH. Schéma inspiré du site :

<http://lyc-chevreuse-gif.ac-versailles.fr/biotech/viro/co/compacite.html>

Famille de gène	Protéines		Fonctions
Protéines de la capside	<i>gag</i>	(N-term) Matrice (Ma)	Ancre à la membrane, interagit avec env, transport nucléaire du core viral
		Capside (Ca)	Protéine de structure de la capside
		Nucléocapside (NC)	Protéine de la nucléocapside, se lie à L'ARN
		Liaison (P6) (C-term)	Se lie à Vpr, joue un rôle dans le bourgeonnement
Protéines enzymatiques	<i>Pol</i>	Transcriptase inverse (RT), RNase H	Rétrotranscription de l'ARN viral en ADN et digestion de l'ARN matrice
		Protéase (PR)	Clivage gag/pol et maturation posttraductionnelle des protéines virales
		Intégrase (IN)	Intégration du provirus dans le génome cellulaire
Glycoprotéine de surface (gp160)	<i>Env</i>	gp120	Glycoprotéine d'enveloppe, se lie au complexe récepteur
		gp41	Glycoprotéines d'enveloppe transmembranaire assurant la fusion du virus avec la cellule
Protéines de régulation	<i>Tat</i>	Transactivation (Tat)	Transactivateur transcriptionnel viral
	<i>Rev</i>	Régulateur de l'expression virale (Rev)	Transporte l'ARN virale du noyau vers le cytoplasme et le stabilise
Protéines accessoires	<i>Vif</i>	Infectiosité virale (Vif)	Affecte l'infectiosité des particules, aide à l'assemblage des virus et à la maturation
	<i>Vpr</i>	Protéine virale R (Vpr)	Régulateur positif de la transcription, augmente la production des virus, favorise la localisation nucléaire du complexe de préintégration, inhibe la division en bloquant le cycle cellulaire en G2/M
	<i>Vpu</i>	Protéine virale U (Vpu)	Induit le relargage extracellulaire des particules virales, dégrade la molécule du CD4 dans le RE
	<i>nef</i>	Facteur de régulation négatif (Nef)	Régule négativement l'expression de la molécule du CD4 et du CMH I, augment la réplication du virus <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i>

Tableau 1 : Protéines du VIH et leurs rôles. Ref Annual review of biochemistry Frankel et al 1998 (A & Young, 1998).

5 Cycle de réplication du virus

5.1 Entrée du virus dans la cellule cible

La gp120 et la gp41 sont les deux glycoprotéines virales impliquées dans les étapes initiales de l'infection par le VIH. Elles sont issues du clivage de la gp160 par la protéase. La gp120 va interagir avec le CD4 entraînant un changement de conformation de la glycoprotéine permettant à la boucle V3 d'interagir avec le corécepteur CCR5 ou CXCR4. La gp41 possède deux structures trimériques d'hélice α appelées *coiled coil*, l'une en amont de l'extrémité N-terminale et l'autre en aval de la région d'ancrage à la membrane en C-terminal (Chan et al. 1997). Après l'interaction de la gp120 avec les récepteurs CD4 et CCR5, un changement de conformation de la gp41 va permettre de libérer la région N-terminale portant les peptides de fusion (fig. 3, région dénommée F). Après l'ancrage des peptides de fusion dans la membrane cellulaire, les deux structures en hélices α qui possèdent une orientation antiparallèle, vont pouvoir se replier sur elles-mêmes forçant ainsi le rapprochement de la membranes virale et cellulaire (fig. 3) (Weissenhorn et al. 1997). Cette étape permet la libération de la capside, du génome et des protéines virales dans la cellule

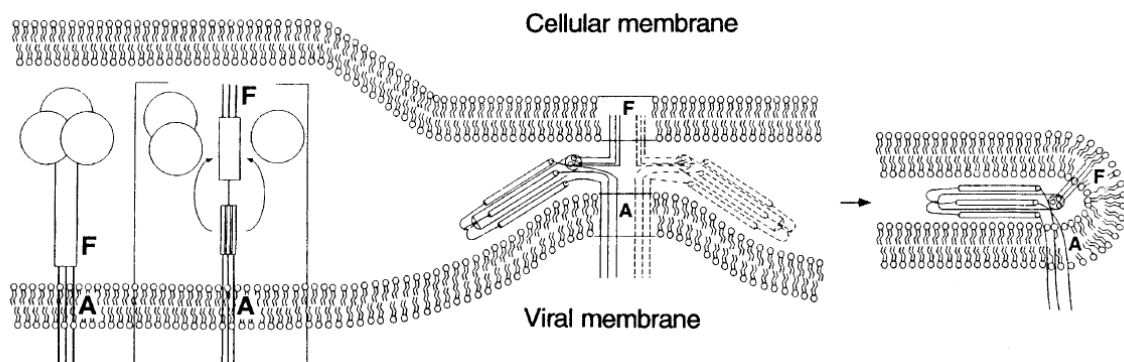


Figure 3 : Mécanismes de repliement de la gp41 permettant la fusion du VIH avec la cellule-hôte. Extrait de Weissenhorn et al. Nature, 1997.

5.2 Evénement de pré-intégration

5.2.1 Rétrotranscription

Après l'entrée du virus dans le cytoplasme de la cellule, l'ARN est libéré de la capsid. Il va se complexer avec des protéines virales (RT, MA, Vpr et l'IN) pour former le complexe de rétrotranscription (RTC) permettant la rétrotranscription de l'ARN en ADN. La RT possède deux fonctions catalytiques, une synthétisant l'ADN (ADN polymérase) et une dégradant l'ARN (RNase H). La rétrotranscription est initiée par la fixation d'un ARNt sur un site PBS (Primer Binding Site) d'un ARN viral en aval du LTR5'. La RT synthétise un ADN complémentaire à polarité négative vers l'extrémité 5' du LTR5', formant transitoirement un complexe ARN/ADN. L'ADN- va être ensuite libéré suite à la dégradation de l'ARN⁺ et cet ADN- va jouer le rôle d'amorce en se fixant sur le LTR3' de l'ARN. La synthèse complète d'un ADN- complémentaire va débiter et en parallèle de l'activité polymérase, la RNase H va dégrader l'ARN⁺ presque intégralement à l'exception de deux régions riches en purine appelée polypurine tracts (PPT). Ces deux régions se trouvant dans le gène Pol, le central polypurine tracts (cPPT) et en amont du LTR 3', servent toutes les deux d'amorces pour la synthèse d'un brin d'ADN⁺ complémentaire à l'ADN-. Finalement, le LTR3' d'ADN⁺ va devenir le LTR5' en jouant le rôle d'amorce et ainsi compléter l'ADN⁺ jusqu'au cPPT formant ainsi une zone appelée DNA flap (Fig 4) (Le Grice, 2012). Toutes ces étapes se déroulent au sein du RTC tout en migrant vers le noyau de la cellule en empruntant le réseau de microtubules (McDonald et al., 2002).

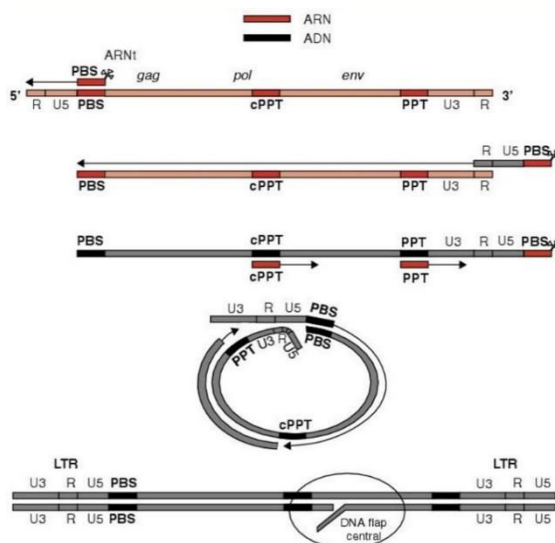


Figure 4 : Etapes de la rétrotranscription. Source de l'image : <http://www.jle.com/e-docs/00/04/17/FF/article.phtml?fichier=images.htm>

5.2.2 Transfert du matériel génétique viral dans le noyau

Une fois la rétrotranscription achevée, le RTC va perdre la RT et former le complexe de préintégration (PIC). Au cours de la dernière étape de la rétrotranscription, il y a la formation d'une région d'ADN triple brin appelé DNA flap. Le rôle précis de la structure DNA flap n'est pas complètement établi mais il est probable qu'elle facilite le transport vers le noyau en stabilisant le PIC. Une étude montre que l'élimination de cette région entraîne une diminution du nombre de provirus intégrés ainsi que de la quantité d'ADNc dans le noyau (Ao, Yao, Cohen, & Cohen, 2004) De plus, les protéines de la matrice, Vpr et de l'intégrase possèdent des signaux de localisation nucléaire (NLS) conférant au PIC des propriétés caryophiles (Bukrinsky, 2004). La protéine virale Vpr permet au PIC d'accéder au noyau en passant au travers des pores nucléaires permettant au VIH d'infecter des cellules hors phase de mitose (Jenkins, McEntee, Weis, & Greene, 1998).

5.3 Intégration et événement post-intégration

5.3.1 Intégration

Avant l'entrée du PIC dans le noyau, l'ADN viral subit une transformation dans le cytoplasme indispensable à l'intégration. Ce mécanisme, appelé 3'-processing, permet l'élimination des deux nucléotides GT présents à l'extrémité 3' des LTR, via l'intégrase. Une fois dans le noyau l'intégrase va ouvrir l'ADN cible et intégrer l'ADN viral. Les nucléotides viraux non appariés sont éliminés et l'ADN cellulaire est ensuite réparé (fig 5) (Engelman et al. 1991).

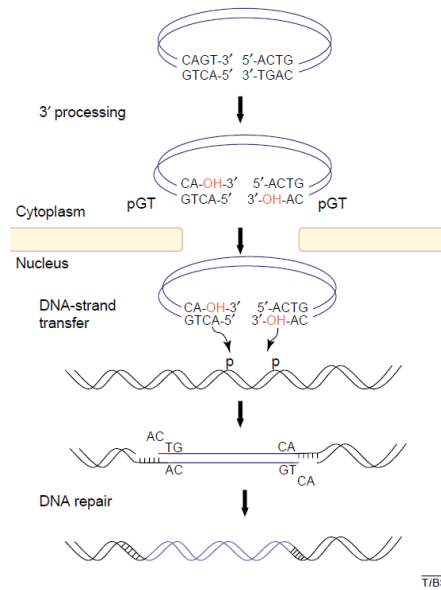


Figure 5 : Mécanismes moléculaire de l'intégration du VIH. Extrait de Van Maele et al, 2006 Trends in biochemical sciences.

Des protéines cellulaires sont également impliquées dans les mécanismes d'intégration du virus. La principale, Lens Epithelium-derived Growth factor (LEGDf/p75) possède un domaine de fixation de l'intégrase (IBD : Integrase Binding Site) ainsi qu'un domaine de fixation à la chromatine. Ces deux domaines favorisent la formation d'un complexe intégrase-ADN indispensable pour l'intégration du provirus (Cherepanov et al., 2003). Hors infection VIH, le LEDGF/p75 est une protéine considérée comme un facteur de survie, car elle est capable d'initier la transcription de gènes anti-apoptotiques (Shinohara et al. 2002).

Le choix du site d'intégration du provirus dans le génome de la cellule n'est pas un mécanisme totalement aléatoire. En effet, le VIH s'intègre préférentiellement dans les unités transcriptionnelles correspondant à des régions actives du génome. Une étude dans la lignée cellulaire SupT1 montre que plus de 66% des sites d'intégration sont dans des gènes alors que les gènes ne représentent qu'environ 30% du génome (Schröder et al., 2002).

Les provirus intégrés ne représentent finalement qu'une très faible proportion des virus dans la cellule. La forme majoritaire est un ADNc linéaire, directement issu de la rétrotranscription, mais il existe également diverses formes circulaires. Des phénomènes d'auto-intégrations ou de recombinaisons homologues entre les ADN viraux expliquent l'existence de ces formes épisomales. Ces virus non-intégrés jouent un rôle important dans la réplication virale. En effet, la protéine Vpr va pouvoir induire la transcription de gènes viraux,

notamment le gène *tat*, qui eux-mêmes initieront la transcription du provirus (revue dans (Sloan et al. 2011)).

5.3.2 Production des protéines virales

La transcription du génome viral va débiter depuis le LTR 5', les régions U3 et R jouant le rôle de promoteur. De nombreux ARNm multi-épissés sont générés pendant les phases précoces de la réplication virale et ces petits ARNm permettent la synthèse des protéines Tat et Rev. La protéine Tat est un puissant activateur transcriptionnel se fixant sur l'ARNm en début de synthèse portant une structure en tige-boucle située immédiatement en aval du site d'initiation de la transcription (Laspia, Rice, & Mathews, 1989). La protéine Tat permet de recruter un complexe Cycline T1/CDK9 (Cycline-Dependent Kinase) qui en s'associant à la RNA polymérase II va initier l'élongation de l'ARNm (P. Wei, Garber, Fang, Fischer, & Jones, 1998). La protéine Rev quant à elle, permet la transition entre la phase précoce et la phase tardive de l'expression des gènes viraux. Elle peut également se fixer sur des structures tiges-boucles de l'ARN appelées Rev Response Element (RRE) localisées dans le gène *pol* permettant ainsi l'export d'ARNm longs comprenant des introns (ARN non épissés ou simplement épissés) du noyau vers le cytoplasme tout en augmentant leur demi-vie. L'export de ces ARNm diminue le pool d'ARN dans le noyau pouvant être multi-épissés entraînant un rétrocontrôle de la production des protéines Tat et Rev. Les ARNm longs permettent quant à eux la synthèse des protéines virales Gag, Pol et Env indispensables pour générer de nouveaux virions (Felber, Drysdale, & Pavlakis, 1990).

Le VIH est capable de rester dans la cellule à un état latent, durant lequel aucune protéine virale n'est produite. Ce phénomène de latence est à l'origine des réservoirs viraux, tenus pour responsable de l'échec des trithérapies à éradiquer le virus. Cet état de latence, indépendant du site d'intégration du provirus, est induit par l'occupation du LTR5' par le nucléosome Nuc-1. Ce dernier se situe au niveau du site d'initiation de la transcription bloquant par encombrement stérique le recrutement du complexe transcriptionnel (Verdin, et al. 1993). L'activation de cellules au repos via l'engagement du TCR ou le contact avec des cytokines pro-inflammatoires, induit la production de facteurs nucléaires comme NFκB ou NFAT aboutissant à l'acétylation du nucléosome Nuc-1. Cette acétylation induit à son tour un changement de conformation de la chromatine rendant accessible le LTR5' au complexe transcriptionnel (Mbonye et al. 2014).

5.3.3 Formation des virions

La formation d'un nouveau virion nécessite deux copies de l'ARN génomique, les protéines virales de l'enveloppe, la polyprotéine Gag, et les trois enzymes virales : l'intégrase, la protéase et la rétrotranscriptase. Les protéines Gag à 4 domaines sont synthétisées dans le cytoplasme. Le domaine de la Matrice (Ma), permet la fixation au niveau de la membrane plasmique et le recrutement de la protéine d'enveloppe. Le transfert de la gp160 à la membrane est assuré par la voie de sécrétion cellulaire impliquant le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi. Durant ce transfert, la protéine gp160 va subir des modifications post-traductionnelles comme la glycosylation et va également être clivée et former un hétérodimère gp120 et gp41. Le domaine de la Capside (Ca) permet des interactions protéine-protéine entre les différentes Gag au niveau de la membrane, permettant la formation de la capsid. Le domaine de la Nucléocapside (NC) possède des motifs en doigts de zinc permettant de capter les deux copies du génome viral via leur séquence ψ . Ce domaine jouera également le rôle de protéine chaperonne lors de l'initiation de la rétrotranscription. Finalement, le domaine P6 est un domaine de fixation des protéines accessoires comme Vpr. Il permet également de recruter des protéines de la machinerie ESCRT (Endosomal Sorting Complexes Required for Transport) impliquées dans le bourgeonnement des virions. L'association des domaines de la capsid entre eux va induire la formation d'une vésicule immature sphérique comportant toutes les éléments viraux. L'étape de maturation va permettre le clivage par la protéase de la polyprotéine Gag et libérer toutes ses sous-unités (Ma, Ca, NC, P6). Cette ultime étape induit un réarrangement des protéines virales formant ainsi la capsid et le virion devient à son tour infectieux (revue dans (Sundquist et al. 2012).

5.3.4 Facteurs de restrictions cellulaires

Naturellement, les cellules possèdent un arsenal de molécules intracellulaires pour lutter contre les infections virales. Parmi l'ensemble de ces molécules, appelées facteurs de restrictions, certaines ciblent des étapes du cycle du VIH. On a identifié chez l'Homme cinq facteurs de restrictions anti VIH :

-APOBEC3G : Inhibe la rétrotranscription et l'intégration (Bishop et al. 2008 ; Mbisa et al. 2007)

-TRIM5 α : Bloque la décapsidation et l'intégration (Stremlau et al., 2004a).

-SAMHD1 : Influe sur la biodisponibilité des dNTP (Hrecka et al., 2011).

-Tetherin : Bloque la libération du virion (Neil et al. 2008).

-TREX-1. : Elimine les brins d'ADN non productifs du cytoplasme et inhibe la réponse immunitaire dirigée contre le VIH (Yan, Regalado-Magdos, Stiggelbout, Lee-Kirsch, & Lieberman, 2010).

Le VIH a réussi à s'adapter et à évoluer pour surmonter l'ensemble de ces facteurs. Les protéines accessoires (Vif, Vpu et Vpx) jouent un rôle majeur dans l'échappement aux facteurs de restrictions chez l'Homme (fig 6). En revanche, les facteurs de restrictions simiens sont toujours efficaces contre le VIH, ceci expliquant en partie pourquoi les singes sont résistants à l'infection par ce virus (Stremlau et al., 2004a).

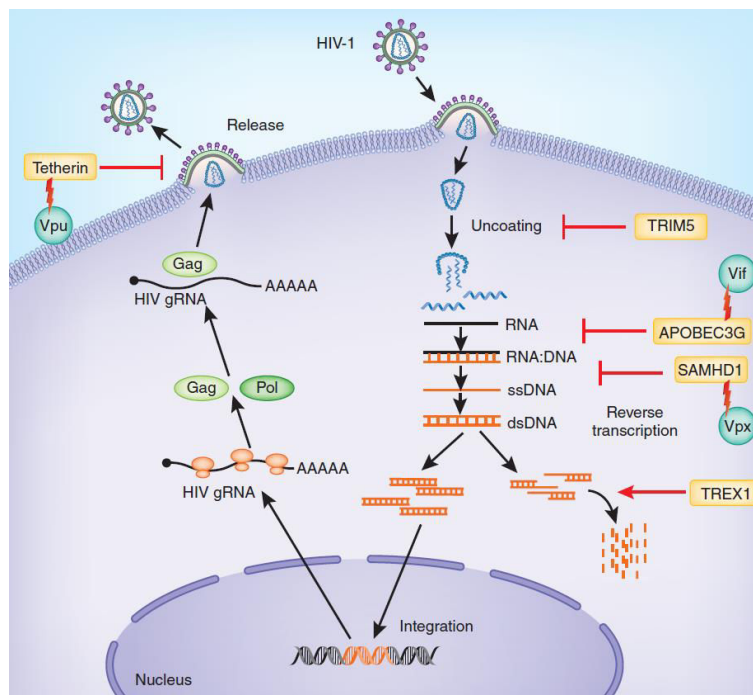


Figure 6 : Cible d'action des facteurs de restrictions sur le cycle viral. Extrait de Yan et al. Nature Immunology 2012

6 Physiopathologie de l'infection par le VIH

6.1 Infection par le VIH et évolution de la maladie

La cinétique de l'évolution de la maladie chez l'Homme est maintenant bien connue et est divisée en trois phases. La première phase, dite aiguë, dure quelques semaines après

l'infection par voie mucoale et est caractérisée par un pic de la charge virale, associé à une délétion massive des lymphocytes TCD4 dans le tractus gastro-intestinal et dans le sang (fig 7). Cette phase se traduit chez le patient par des symptômes grippaux à savoir de la fièvre, une adénopathie et des myalgies (Gurunathan et al., 2009). Des études chez le singe montrent que, lors de la primo infection, le VIS traverse les muqueuses en quelques heures, ensuite, en quelques jours seulement, le virus atteint les ganglions drainant du GALT (gut-associated lymphoid tissue) et y induit une délétion des lymphocytes T CD4 (Q. Li, Duan, Estes, Ma, & Rourke, 2005). Ces résultats corrént avec ceux trouvés chez l'Homme, car des individus infectés présentent également une délétion massive des CD4 dans ces tissus (Guadalupe et al. 2003). Plus spécifiquement, il a été montré que le VIH induisait une délétion des lymphocytes T CD4⁺ présentant un phénotype Th17. Ces cellules jouent un rôle important dans l'immunité antibactérienne ainsi que dans le maintien de l'intégrité de la barrière muqueuse de l'intestin. La perte rapide de ces cellules favorise donc la translocation bactérienne (Brenchley et al., 2006) (Brenchley et al., 2008). La translocation de produits bactériens, comme le lipopolysaccharide (LPS) active directement les macrophages et les DC via les Toll-like Receptor (TLR). De plus, il y a une corrélation directe entre les niveaux plasmatiques du LPS et la fréquence de lymphocytes T CD8 activés. Ces résultats montrent que la translocation de produits bactériens permet l'activation des systèmes immunitaires innés et adaptatifs (Brenchley et al., 2006).

La résolution de la charge virale après le pic coïncide avec l'émergence de la réponse T cytotoxique suggérant qu'elle participe au contrôle de la charge virale par une réponse immunitaire spécifique (Koup et al. 1994). De plus, la délétion des lymphocytes T CD8 chez le singe et la souris humanisée entraîne une augmentation de la charge virale dans ces animaux et semble confirmer que les lymphocytes T CD8 participent à la résolution de la charge virale (Jin et al. 1999), (Gaufin, Ribeiro, Gautam, & Dufour, 2010). De plus pendant cette phase, de nombreux variant viraux émergent et ces derniers ne possèdent plus les épitopes reconnus par les lymphocytes T CD8, suggérant une forte pression de sélection du système immunitaire sur le virus (Bernardin et al. 2005). Néanmoins, il est apparu récemment que les lymphocytes T CD8 ne contrôlent pas la charge virale par un effet direct de cytolysse des cellules infectées (Davenport et al. 2010). Les mécanismes par lesquels les lymphocytes T CD8 contrôlent la charge virale restent mystérieux.

La seconde phase, dite asymptomatique, voit la charge virale monter progressivement associée à une baisse lente mais constante des lymphocytes T CD4 (fig 7). Cette phase dure quelques années et aboutit sans traitement au stade SIDA. Le stade SIDA est atteint cliniquement lorsque les patients présentent un nombre de lymphocytes T CD4 inférieur à 200 / μ l de sang (fig 7). En l'absence de traitement antirétroviral permettant de les restaurer, ces patients sont sujets à des infections opportunistes pouvant entraîner la mort (Naif et al. 2013).

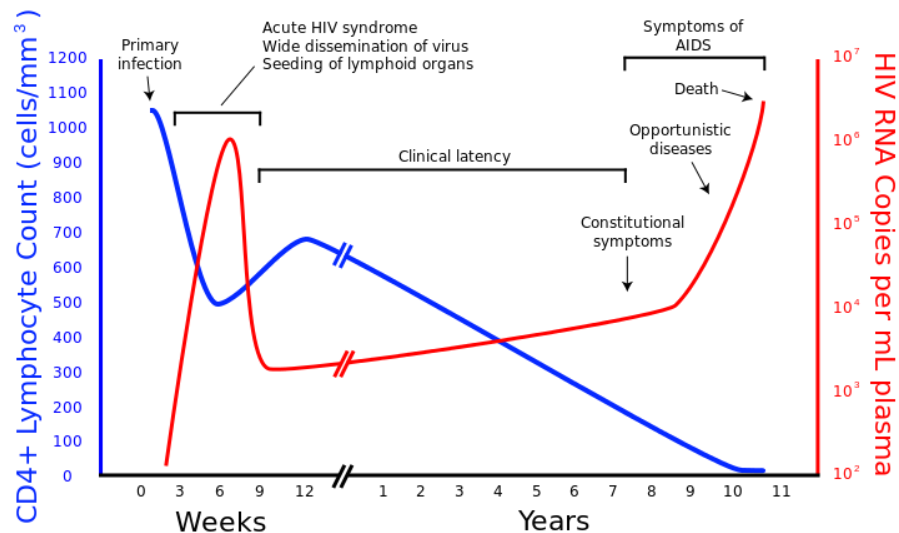


Figure 7 : Evolution de la charge virale et de la déléction des lymphocytes T CD4 chez l'homme dans un contexte sans antirétroviraux.

(Source : http://en.wikipedia.org/wiki/VIH#mediaviewer/File:VIH-timecourse_copy.svg)

6.2 Les réservoirs viraux

Le plus grand succès dans la lutte contre le VIH est le développement des traitements antirétroviraux. Ces drogues ont permis de prolonger très significativement la durée de vie des patients car il y a une forte corrélation entre la charge virale, le nombre de lymphocytes T CD4 et l'espérance de vie (Costagliola et al. 2014). La trithérapie permet aux patients d'abaisser la charge virale plasmatique à des seuils indétectables et aussi de restaurer un pool de lymphocytes T CD4 (Powderly et al. 1998) (Gorochov et al. 1998). Malheureusement ces traitements ne permettent pas l'éradication complète du virus et le retrait des drogues s'accompagne invariablement d'un retour de la charge virale chez les patients (Davey et al., 1999). Ces résultats prouvent l'existence de réservoirs viraux. De plus, une étude montre que la prise d'un traitement antirétroviral dès les premiers symptômes, quelques semaines après

l'infection, ne prévient pas la formation de réservoirs ce qui suggère qu'ils se mettent en place très précocement dans l'infection (Chun et al. 1998).

La décroissance de la virémie sous ART (antirétroviral therapy) peut être divisée en quatre phases distinctes en corrélation avec la demi-vie des cellules infectées. La première phase très rapide est caractérisée par une forte baisse de la charge virale plasmatique et comprend la disparition des virions libres dans le sang et des lymphocytes T CD4 activés infectés ; tous deux possèdent des demi-vies très courtes de 6 heures et de 1,6 jours respectivement (Wei et al. 1995), (Ho et al. 1995). Néanmoins, la disparition des lymphocytes T CD4 du sang pourrait refléter leur mobilisation ailleurs dans l'organisme plutôt que leur disparition physique. A notre connaissance, ce point reste non résolu à ce jour. La seconde phase, plus lente correspond à la perte des lymphocytes T CD4 partiellement activés, des macrophages et des DC. La demi-vie des macrophages infectés est estimée à quelques semaines, mais celle-ci dépend du tissu dans lequel ils se trouvent. Une étude réalisée chez le singe montre que les macrophages sont les principales cellules productrices de VIH dans le système nerveux central (CNS). De plus, ces cellules ont une longue durée de vie et on estime qu'il faut deux à trois mois pour renouveler 30% de la population (Williams et al., 2001). Comme pour les macrophages, la demi-vie des DC est estimée à quelques semaines mais dépend également de leur sous-type et de leur localisation anatomique (Coleman & Wu, 2009). Ces deux populations cellulaires sont donc considérées comme des réservoirs viraux de par leur demi-vie plus ou moins longue et leur présence dans tissus qualifiés de sanctuaires pour le VIH. Finalement, les phases trois et quatre sont caractérisées par la présence de cellules à très longue demi-vie. Ces cellules sont des lymphocytes T CD4 mémoire au repos infectés à l'état latent et ils sont considérés comme étant les principaux réservoirs du virus (Stevenson et al. 2013).

Les lymphocytes T mémoire sont divisés en au moins trois sous-populations définies par l'expression de surface de nombreuses molécules différentes :

- Les centrales mémoire (T_{CM}) présents principalement dans les organes lymphoïdes secondaires; ils sont activés par des DC et permettent de générer rapidement une seconde vague de lymphocytes T effecteurs.

- Les effecteurs mémoire (T_{EM}) issus des T_{CM} , sont présents dans les tissus périphériques et peuvent induire une réponse effectrice rapide en cas d'activation.

- Les transitionnels mémoire (T_{TM}) ont un phénotype intermédiaire entre les T_{CM} et les T_{EM} .

-Les cellules-souches mémoire (T_{SCM}) dont le maintien semble crucial pour la mémoire immunitaire à long terme.

Une étude, réalisée chez des patients sous traitement, visait à identifier la répartition des lymphocytes T CD4 infectés au repos. Elle montre que 98% des cellules infectées sont de type mémoire (52% de T_{CM} , 34% T_{TM} , 14% T_{EM}) et 2% sont des cellules naïves (Chomont et al., 2009). Les cellules au repos sont très résistantes à l'infection par le virus car elles présentent de faible niveau de CCR5 (Bleul, Wu, Hoxie, Springer, & Mackay, 1997) et l'activité de la RT est restreinte par une protéine cellulaire SAMHD1 (SAM domain and HD domain-containing protein 1) qui diminue le pool de dNTP cellulaire (Descours et al., 2012). De plus, les cellules naïves sont moins susceptibles à l'infection que les cellules mémoires mais ces deux types cellulaires peuvent être malgré tout infectés *in vitro* (Dai et al., 2009). Une étude menée dans un modèle de souris humanisées, greffée avec des fragments de thymus et de foie fœtal humains, suggère que l'infection des cellules naïves pourrait avoir eu lieu dans le thymus pendant la maturation des lymphocytes T (Brooks et al. 2001)

Il existe des tissus privilégiés, appelés sanctuaires dans lesquels on retrouve les cellules réservoirs, comme le système nerveux central ou le tractus gastro-intestinal. Les antirétroviraux présentent des concentrations plus faibles dans ces tissus suite à une moindre diffusion ou une métabolisation altérée de ces molécules. Une étude menée chez le rat utilisant un analogue radiomarqué d'un inhibiteur de la rétrotranscriptase, montre une répartition de la molécule très différente en fonction des tissus. Les concentrations trouvées dans la rate et les ganglions mésentériques sont deux fois plus faibles et vingt-cinq fois plus faibles dans le cerveau en comparaison avec la concentration plasmatique (Di Mascio et al., 2009). Dans une autre étude, des patients avirémiques traités par ART depuis plusieurs années présentent des niveaux de provirus intégrés supérieurs dans les tissus du GALT en comparaison au sang (Chun et al. 2008). Des analyses phylogénétiques montrent de forts degrés de similarité entre les virus présents dans les GALT et ceux dans les PBMC, suggérant que l'intestin fournit un site d'infection pour les PBMC circulants (Chun et al. 2008), (Imamichi et al., 2011).

Finalement, les GALT sont les principaux sanctuaires pour le VIH car en plus d'une faible biodisponibilité des antirétroviraux dans ces tissus, l'état d'activation chronique, induit par la translocation bactérienne, permet le recrutement de lymphocytes T CD4 activés, le tout favorisant une production virale.

6.3 Mécanismes impliqués dans la délétion des lymphocytes T CD4

La délétion des lymphocytes T CD4 est le paramètre clinique majeur dans l'infection puisque sans traitement, elle conduit au stade SIDA et à la mort du patient. De nombreuses études se sont intéressées aux mécanismes induisant la mort de ces cellules et aujourd'hui encore plusieurs hypothèses demeurent. Dès 1993, une équipe a proposé l'idée que la mort cellulaire pouvait être induite par l'apoptose dans des cellules infectées et non infectées (Ameisen et al. 1991). Cette hypothèse a été par la suite confirmée chez des patients, prouvant ainsi que des cellules infectées peuvent induire l'apoptose dans des cellules non infectées par un mécanisme indirect (Finkel et al. 1995). De nombreuses études ont également montré que les protéines virales Env, Tat, Nef, Vpu, Vpr possèdent des propriétés pro-apoptotiques sur des cellules non infectées (Gougeon et al. 2005). De plus, d'autres mécanismes plus directs de cellules infectées à cellules non infectées mettent en jeu l'interaction des récepteurs de mort avec leurs ligands (Fas/Fas ligand, TNF/TNFR1, TRAIL/TRAIL-R1,2) (Lelièvre et al. 2005). Ces interactions aboutissent à l'activation des caspases 3, 8 et 9, initiant ainsi les premières étapes de l'apoptose (revue dans (Miura et al. 2005)).

Deux études parues en 2014 proposent des nouveaux mécanismes pour expliquer la délétion des lymphocytes T CD4 induits par le VIH. Un de ces études propose la nécroptose, qui contrairement à la nécrose, est un mécanisme de mort programmée. Cette étude réalisée *in vitro*, montre qu'une mort cellulaire peut être induite dans des cellules via le récepteur au TNF α mais de façon indépendante de la caspase 8, et qu'elle touche principalement les cellules infectées (Pan et al., 2014).

L'autre étude vient quant à elle bouleverser le dogme impliquant l'apoptose dans la délétion des lymphocytes T CD4 chez les patients infectés (Doitsh et al., 2014). Cette étude est basée sur l'histoculture qui permet la culture de tissus frais d'amygdale ou de rate tout en conservant l'architecture du tissu (Glushakova et al. 1995). Dans ce modèle, où le microenvironnement du tissu est conservé, l'infection par le VIH induit une délétion massive des lymphocytes T CD4 alors que 95% des cellules mourantes n'ont pas été infectées de façon productive. Cette étude démontre que cette mort cellulaire est induite par un mécanisme appelé pyroptose. La pyroptose est un mécanisme de mort cellulaire induit par une réponse immunitaire innée intracellulaire impliquant le complexe de l'inflammasome. Ce dernier est activé après la reconnaissance de motifs moléculaires associés au danger (DAMPs) grâce à des récepteurs intracellulaires appelés NLR (Schroder et al. 2010). Dans le cas du VIH, il

semblerait que l'état de repos des cellules pseudo-infectées empêche la RT de fonctionner parfaitement, mécanisme lié à SAMHD1 et ces acides nucléiques incomplets peuvent entraîner l'activation de voies pro-apoptotiques et des réponses pro-inflammatoires (Descours et al., 2012). De plus, dans une autre étude, les auteurs ont démontré que des ADN viraux incomplets simple brin ou double brin d'environ 500 bases issue de l'inhibition de la RT pouvaient activer la caspase-1 impliquée dans l'inflammasome ainsi que la caspase 3 impliquée dans l'apoptose (Doitsh, Cavrois, Lassen, & Zepeda, 2010). La même équipe a récemment démontré que l'inhibition de la caspase-3 dans des lymphocytes T issus de patient infectés ne prévenait pas la mort cellulaire contrairement à l'inhibition de la caspase-1 (Doitsh et al., 2014). De plus, la pyroptose induit un relargage de cytokines pro-inflammatoires (ex: IL-1 β) dans le tissu contrairement à l'apoptose, favorisant ainsi le recrutement de nouvelles cibles pour le virus.

Les auteurs ont également réalisé des biopsies de ganglions lymphoïdes, chez des patients infectés non traités présentant de fortes charges virales et un faible nombre de CD4 dans le sang. Les analyses immuno-histochimiques de ces tissus montrent que les cellules infectées activent la voie de la caspase-3 alors que les cellules non-infectées au repos activent principalement celle de la caspase-1, reproduisant les observations réalisées *in vitro*. Finalement, ce mécanisme semble beaucoup plus favorable pour le virus que l'apoptose car cette mort cellulaire permet le recrutement et l'activation de nouvelles cibles et favorise la propagation du virus (Doitsh et al., 2014). Ces résultats montrent donc que pour prévenir la délétion des lymphocytes T CD4, il faudra prévenir au maximum l'activation des NLR par les ADN viraux.

7 Les antirétroviraux

7.1 Bénéfices et effets indésirables des traitements antirétroviraux

Les traitements antirétroviraux (ARV) sont très efficaces et permettent de contrôler la réplication virale chez les patients infectés, ou bien de prévenir la transmission du virus d'une mère à son enfant ou encore entre deux conjoints sérodiscordants. Malheureusement, comme beaucoup de molécules pharmaceutiques, ces drogues possèdent une certaine toxicité et ces traitements sont associés à des effets secondaires. Ces derniers sont dépendants de la classe des ARV utilisés et de leur durée d'utilisation. A court terme on a identifié des atteintes gastro-intestinales avec des nausées, des vomissements et des diarrhées. Ces trois troubles sont les principales raisons d'arrêt précoce du traitement. Plus rarement, dans moins de 10%

des cas, on observe également des éruptions cutanées, des réactions d'hypersensibilités (fièvre, douleurs abdominales, douleurs musculaires etc.) ou encore des atteintes neurologiques (rêves agités, une marche instable, des étourdissements ou une somnolence etc.). A long terme, les individus vivant avec le VIH répondant bien à leur traitement ARV ont vu leur durée de vie augmenter et cette population vieillissante se voit maintenant exposée aux mêmes pathologies que des individus non infectés. Cependant l'incidence de ces maladies augmente, comme les maladies cardiovasculaires, ou encore des dysfonctionnements hépatiques ou rénaux (Hawkins, 2010). La consommation de médicaments augmente avec l'âge et chez les personnes atteintes par le VIH, le risque d'interactions médicamenteuses augmente en parallèle. Il serait donc intéressant de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques qui permettraient un contrôle de la charge virale et une protection des lymphocytes T CD4, sans cette toxicité médicamenteuse.

7.2 Les différentes classes d'antirétroviraux

La connaissance approfondie du cycle de réplication du VIH a permis de découvrir plusieurs cibles thérapeutiques potentielles. Il existe à ce jour six classes d'antirétroviraux ciblant toutes une étape précise du cycle virale.

-Les inhibiteurs d'entrée visent à inhiber les étapes de fusion du virus avec la cellule.

Il en existe deux types :

-Les inhibiteurs de fusion ciblant la gp41 du virus.

-Les inhibiteurs du corécepteur ciblant le corécepteur CCR5 de la cellule.

-Les inhibiteurs de la transcriptase inverse virale bloquent l'élongation de l'acide nucléique viral. Il en existe trois types:

-Les inhibiteurs nucléosidiques de la transcriptase inverse (INTI) sont des nucléosides qui vont entrer en compétition avec les nucléosides naturels et stopper l'élongation.

-Les inhibiteurs nucléotidiques agissent de la même façon que les INTI.

-Les inhibiteurs non nucléosidiques (INNTI) vont inhiber l'action de la RT en se fixant directement dessus.

-Les inhibiteurs de la protéase virale vont bloquer l'action de la protéase indispensable à la maturation des particules virales.

-Les inhibiteurs de l'intégrase sont les derniers ARV développés et montrent une très bonne efficacité antirétrovirale en inhibant l'intégration du virus.

Selon le rapport 2013 du conseil national du sida, réalisé en collaboration avec l'ANRS, il est préconisé d'initier un traitement ARV chez toutes les personnes vivant avec le VIH, et ce indépendamment de la charge virale et du nombre de CD4 dans le sang. L'organisation mondiale de la santé (OMS) préconise quant à elle de débiter le traitement ARV à partir d'un nombre inférieur à 500 CD4/ μ l de sang car les preuves d'un bénéfice individuel pour le patient en terme de mortalité ou de progression vers un stade SIDA sont plus faibles au-delà de ce seuil. Il existe aujourd'hui plus d'une vingtaine de molécules ARV réparties dans les six catégories précédentes. Les traitements combinés (HAART) communément appelés trithérapies comportent le plus souvent deux INTI associés à un troisième agent. Le choix des molécules est fait en accord avec le patient, selon la tolérance au médicament, les interactions médicamenteuses et le rythme de vie du patient car une bonne observance au traitement est indispensable pour une efficacité optimale (Morlat et al. 2013).

7.3 Emergence de résistance au ARV

Le développement de virus résistants aux ARV peut être imputé à la RT qui génère beaucoup d'erreurs lors de l'étape de la rétrotranscription. Il a été montré que cette enzyme introduisait une mutation tous les 3×10^5 bases par cycle de réplication (Mansky et al. 1995). Tous les mutants générés ne sont pas sélectionnés car beaucoup de mutations diminuent les aptitudes du virus. Le système immunitaire et les ARV induisent une forte pression de sélection sur le virus favorisant l'émergence de variants viraux. Ces derniers ne possèdent plus l'antigène reconnu par la réponse CTL, ou bien la modification d'un acide aminé sur la RT empêche la fixation des inhibiteurs. Chaque ARV possède une barrière génétique de résistance comprenant le nombre de mutations et la fréquence d'apparition de ces mutations nécessaires au virus pour qu'il devienne résistant. De plus, deux facteurs augmentent le risque d'émergence de variants résistants; le premier est la durée d'un traitement ARV et le second est la charge virale. Plus un traitement dure longtemps sans abaisser la charge virale, plus le risque de résistance augmente (Emamzadeh-Fard, Fard, SeyedAlinaghi, & Paydary, 2012). De plus, des études montrent qu'une bonne observance du traitement n'élimine pas totalement le risque de générer des mutants, car plus de 50% des mutations résistantes se trouvent chez des patients ayant une observance comprise entre 79 et 100% (Emamzadeh-Fard et al., 2012).

Dans la partie suivante nous allons nous intéresser principalement aux résistances associées aux inhibiteurs d'entrée.

Le Maraviroc est un inhibiteur allostérique qui bloque la fixation du VIH sur le corécepteur CCR5. Bien que les souches à tropisme R5 soient préférentiellement transmises lors de l'infection (Schuitemaker et al. 1992), il a été montré que la grande majorité des échecs thérapeutiques du Maraviroc sont imputables à la présence de variants X4 très minoritaires non détectés mais déjà présents au moment de l'initiation du traitement (Westby et al., 2006). De plus, des études *in vitro* ont montré que des virus à tropisme R5 pouvaient devenir résistants au Maraviroc tout en conservant leur tropisme (Roche et al., 2011). Basés sur ces résultats, il existe des algorithmes qui permettent de prédire le tropisme d'un virus en analysant la séquence de la boucle V3 et ainsi optimiser le traitement du patient en intégrant ou non le Maraviroc. Le plus utilisé est Géno2Phéno (<http://www.geno2pheno.org/>).

L'Enfuvirtide est à ce jour le seul inhibiteur de fusion présent sur le marché. Cet ARV est un petit peptide de 36 acides aminés, nommé T20, qui en se fixant sur la gp41 va inhiber la fusion entre la cellule et le virus. Bien que ce peptide possède un fort pouvoir antirétroviral, il possède également une faible barrière génétique et induit rapidement des mutants résistants (Lu et al., 2006). Une étude montre qu'une seule mutation dans la gp41 peut conférer une résistance à l'Enfuvirtide plus ou moins forte en fonction de l'acide aminé muté. Cependant ces mutations ont un coût pour le virus car il y a une corrélation inverse entre la résistance au T20 et le pouvoir infectieux du virus. De plus, cette étude montre également que la concentration de la drogue joue un rôle important dans l'émergence de résistance (Lu, Sista, Giguel, Kuritzkes, & Greenberg, 2004). Finalement, la forme galénique de cet ARV lui impose d'être injecté en sous-cutané plusieurs fois par jour rendant son observance assez difficile.

Un mutant viral échappant à la fois à l'inhibiteur de fusion et à l'inhibiteur de CCR5 aurait probablement une adaptation diminuée à l'hôte. D'ailleurs ce type de mutant n'a jamais été décrit chez les patients pour l'instant et n'a été décrit que dans une seule publication dans des conditions *in vitro* extrêmes (Anastassopoulou et al. 2012).

Chapitre II : Prophylaxies et thérapies anti-VIH

1 Modèles animaux pour l'étude du VIH

Le développement de modèles animaux est une étape indispensable dans la recherche de traitements car les études *in vitro* ne permettent pas de reproduire la complexité rencontrée dans un organisme. Concernant le VIH, seul l'Homme et certains grands singes comme le chimpanzé, sont sensibles à l'infection par le virus. De nombreuses études réalisées sur l'Homme ont permis d'augmenter considérablement les champs de connaissances du VIH mais certaines questions scientifiques nécessitent l'utilisation de modèles animaux. Outre l'aspect éthique et financier concernant l'utilisation des grands singes dans la recherche, la physiopathologie de l'infection par le VIH dans le chimpanzé ne mime pas celle de l'Homme. C'est pourquoi les chercheurs ont dû développer de nouveaux modèles animaux se rapprochant au plus près de la physiologie humaine. Un bon modèle d'étude pour le VIH doit donc réunir plusieurs critères (Rongvaux et al., 2013):

- Il doit posséder toutes les lignées et les sous-populations des cellules hématopoïétiques humaines.

- Ces cellules doivent être maintenues dans des proportions et des localisations similaires à celles d'un humain.

- Ces cellules devront être fonctionnelles et pouvoir monter une réponse immunitaire.

- Le modèle devra être susceptible à l'infection par le VIH et présenter une physiopathologie semblable à celle trouvée chez l'Homme.

Il est très difficile de réunir tous ces critères dans un modèle animal et certains compromis sont nécessaires. Il existe deux principaux modèles dans deux espèces différentes pour la recherche sur le VIH, le singe et la souris humanisée. Chacun de ces deux modèles présentent des avantages et des inconvénients. Finalement le choix du modèle dépend principalement de la question scientifique posée pour l'étude en accord avec les forces et les faiblesses des différents modèles.

1.1 Primate

Parmi les primates susceptibles à l'infection par le virus de l'immunodéficience simienne (SIV), on peut distinguer 2 groupes. Le premier groupe est ce que l'on nomme les hôtes naturels du VIS, tous originaires d'Afrique (singe vert d'Afrique, mangabey) et le second groupe comporte les primates non humains (PNH) originaires d'Asie (macaque

rhésus, macaque nemestrina). La physiopathologie de l'infection par le VIS varie beaucoup entre ces deux groupes. Il est maintenant clairement établi que les VIH-1 et -2 sont issus d'une zoonose suite à la transmission d'un lentivirus lymphotropique des primates à l'Homme (Hahn, Shaw, De Cock, & Sharp, 2000).

Bien que les voies de transmissions du virus soient les mêmes et malgré la proximité phylogénétique entre le VIS et le VIH, la physiopathologie de l'infection varie entre l'Homme et le singe. En effet, les singes infectés originaires d'Afrique ne déclenchent pas de stade SIDA, induit par une délétion massive des lymphocytes T CD4, et ce malgré une charge virale très élevée. Plusieurs hypothèses permettent d'expliquer ce phénomène (Chahroudi, Bosinger, Vanderford, Paiardini, & Silvestri, 2012) :

- la coévolution entre le VIS et ses hôtes naturels a permis une sélection à la fois des virus et des hôtes.

- La modulation des récepteurs et des corécepteurs du VIS sur les populations lymphocytaires à longue demi-vie comme les lymphocytes T centraux mémoires.

- Le maintien de l'immunité muqueuse dans l'intestin prévient la translocation bactérienne qui entretiendrait une activation immunitaire chronique au niveau de ces tissus.

- L'absence d'activation immunitaire chronique permet de préserver l'homéostasie des lymphocytes T.

En revanche, l'infection par le VIS "Africain" dans les primates d'origine Asiatique, comme le macaque rhésus, présente des similitudes avec l'infection par le VIH chez l'Homme. En effet, une délétion massive des lymphocytes T CD4 du sang périphérique et des MALT (Tissus lymphoïdes associées aux muqueuses) est corrélée avec la charge virale. Ces animaux présentent également des atteintes au niveau de la barrière épithéliale des muqueuses de l'intestin, favorisant ainsi la translocation bactérienne et une forte activation immunitaire chronique (fig 8). L'utilisation de ces animaux a permis de nombreuses avancées dans l'étude de la physiologie du VIS et par extension du VIH (liste non exhaustive) :

- Dans l'étude de la réponse immunitaire (Wong, Strain, & Porrata, 2010).

- Dans l'étude des réservoirs viraux (Williams et al., 2001).

- Dans l'étude des mécanismes de transmission (Haase, 2005).

- Dans l'étude de la délétion des cellules de l'intestin (Q. Li et al., 2005).

Ces modèles animaux ont également permis de tester différentes stratégies thérapeutiques (liste non exhaustive) :

-Par transfert de gènes dans les cellules souches hématopoïétiques (Trobridge, Wu, Beard, & Chiu, 2009).

-Par transfert de gènes (inhibiteurs d'entrée) dans des lymphocytes T (Younan & Polacino, 2013).

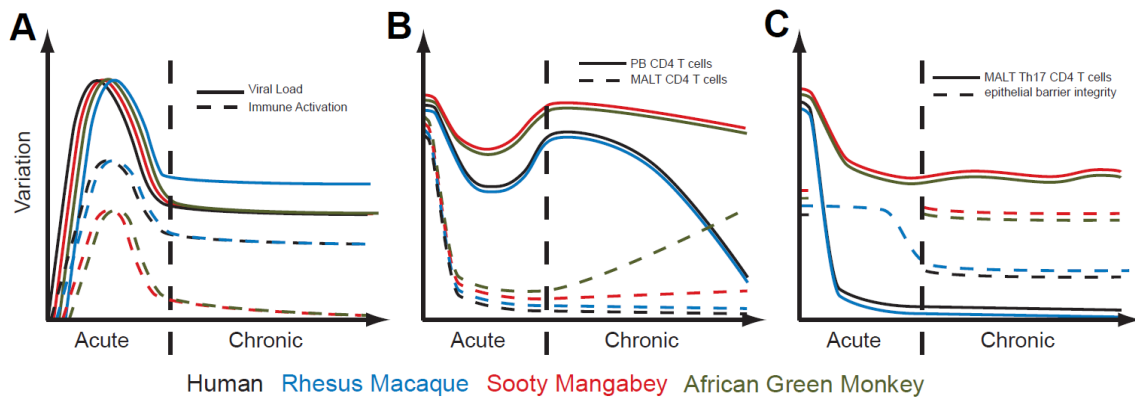


Figure 8 : Evolution de la charge virale et de l'activation immunitaire chez l'Homme, le macaque rhésus d'Asie et deux singes africains, hôtes naturels du VIS : le mangabey et le singe vert. Extrait de J.M Brenchley et al ; Blood 2011.

L'utilisation de PNH pour la recherche biomédicale présente néanmoins de nombreux inconvénients. En effet, l'utilisation de ces animaux est très coûteuse puisqu'elle nécessite une animalerie et du personnel spécialisés. De plus, ces modèles permettent l'étude du VIS qui, bien que proche cousin, n'est pas le VIH. De nombreux paramètres biologiques distinguent aussi les lymphocytes T CD4 du singe et de l'homme (Jacquelin et al., 2007). Dans l'optique de tendre toujours plus vers un modèle de singe susceptible à l'infection par le VIH, des virus hybrides VIS-VIH (SHIV) ont été créés. Par exemple, les gènes *tat*, *rev* et *env* du VIS ont été remplacés par leurs homologues du VIH auquel les auteurs ont ajouté en plus le gène *vpu*. Bien que cette construction n'induit pas un stade SIDA dans les macaques, on trouvera dans ces singes une réponse humorale avec des Ac dirigés contre la gp120 (*env*) (Kuwata et al., 1995). Dans une autre étude de vaccination, les auteurs utilisent un variant du SHIV capable d'induire cette fois une délétion massive des CD4 dans le sang, les organes lymphoïdes et finalement le stade SIDA.

Une étude a récemment démontré que le VIH-1 pouvait infecter, se répliquer et induire un stade SIDA chez des singes après 6 passages successifs dans les animaux. Pour ce faire, les auteurs induisent une délétion des lymphocytes T CD8 pendant la phase aiguë de

l'infection pour diminuer la réponse immunitaire et favoriser l'émergence de nombreux clones. Le sang de ces animaux est ensuite utilisé pour infecter un nouveau groupe de singe. L'analyse des séquences de la gp120 et plus précisément de la boucle V3, impliquée dans la reconnaissance du CCR5, montre une faible divergence de 2% entre la souche utilisée pour l'infection et celle trouvée dans la sixième génération de singe. En revanche, la plupart des mutations ont été trouvées dans le gène *vpu* (Hatzioannou et al., 2014). Cette étude montre la capacité des lentivirus à s'adapter et à devenir pathogène dans un nouvel hôte, en profitant d'une faiblesse du système immunitaire, en l'occurrence une déplétion des T CD8. De plus, cette étude fournit de nouveaux outils permettant de se rapprocher d'un modèle d'infection proche de l'Homme en mimant un stade SIDA.

1.2 Les petits modèles animaux

Le développement de modèles susceptibles à l'infection par le VIH est passé par différentes approches. Certaines stratégies visaient à induire l'expression des récepteurs du VIH, le CD4 et le CCR5, à la surface de cellules de souris, de rat ou encore de lapin (Seay et al., 2013), (Goffinet et al., 2007), (Speck et al., 1998). L'ajout de ces récepteurs à la surface de ces cellules permet l'entrée et l'intégration du virus. En revanche, elles ne permettent pas la production de virus, à l'exception des cellules de lapin. En effet, la protéine Tat ne peut pas interagir avec la cycline-1 de ces espèces, ce qui bloque l'initiation de la transcription du génome viral. L'ajout du gène codant pour la cycline-1 humaine, en plus des récepteurs d'entrée a permis une infection productive, mais trois semaines post-infection, les souris présentent en moyenne une charge virale plasmatique faible (inférieure à 2000 copies/ml) (Seay et al., 2013). L'étude *in vitro*, montre que des cellules de lapin exprimant les récepteurs humains permettent la réplication du virus à des niveaux légèrement inférieurs à ceux rencontrés dans des lignées humaines (Speck et al. 1998). Malgré ces résultats, ce modèle de lapin humanisé, à ma connaissance n'a pas été développé et les modèles de souris et de rat exprimant les récepteurs CD4 et CCR5 ne semblent pas encore totalement optimaux.

S'il est difficile de greffer des gènes humains chez l'animal pour reproduire l'environnement nécessaire à l'infection par le VIH, il est peut-être plus facile de greffer les cellules cibles de l'infection chez l'animal. Le développement des modèles de souris humanisées est intimement lié au développement des souris immunodéficientes. En effet, seules des souris profondément immunodéprimées peuvent tolérer la greffe de cellules humaines sans rejet de greffe.

1.2.1 Développement des souris immunodéficientes

Les délétions successives de gènes murins, impliqués dans le développement ou dans une fonction particulière du système immunitaire, ont permis de générer des souris immunodéficientes. Ces souris ont servi entre autres de support pour la greffe de cellules ou de tissus humains.

Le développement des souris humanisées a débuté à la fin des années 1980 avec la publication de deux articles portant sur l'étude du développement et de la différenciation de cellules humaines *in vivo* (McCune et al., 1988), (Mosier et al. 1988). Ces études ont été réalisées dans des souris immunodéficientes portant la mutation SCID (Severe Combined Immunodeficiency Disease) caractérisée par l'équipe du Dr Bosma (Bosma et al. 1983). Cette mutation $Prkdc^{scid}$ touche une protéine kinase impliquée dans les mécanismes de réparation de l'ADN, ainsi que les mécanismes de recombinaisons des chaînes lourdes et légères des immunoglobulines et du récepteur T. Les mutations SCID induisent chez les souris une radiosensibilité ainsi qu'une lymphopénie touchant principalement les lymphocytes T et les lymphocytes B (Siple et al., 1995).

La recombinaison V(D)J est un mécanisme de recombinaison de deux ou trois ensembles de gènes permettant de générer un très grand nombre des récepteurs des lymphocytes T, B (TCR ou BCR) ou des Ac reconnaissant des milliers d'Ag différents. Ce mécanisme est assuré en partie par les gènes RAG-1 et RAG-2 (Recombinase Activity Gene) et leur délétion induit un phénotype similaire à la mutation SCID (Schatz et al. 1989 ; Oettinger et al. 1990). Alors qu'il avait été très difficile d'observer une maturation finale des lymphocytes T dans ces modèles, l'ajout de la mutation sur le gène de la chaîne γ_c (CD132), commune à plusieurs récepteurs d'interleukines (IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15 et IL-21), a permis l'élimination des cellules Natural Killer (NK). Ce sont donc ces dernières qui semblaient jouer un rôle délétère dans le développement des lymphocytes T humains.

La mutation γ_c associée aux mutations SCID ou RAG génère des modèles doubles KO (DKO), profondément immunodéficients car dépourvus de lymphocytes T, de lymphocytes B et de cellules NK. Ces modèles soutiennent la greffe et la différenciation des Cellules Souches Hématopoïétiques humaines contenues dans la fraction de cellules $CD34^+$ (CSHh) de la moelle osseuse ou de sang de cordon. Après greffe de ces dernières, le développement de lymphocytes T est observé entre 3 à 4 mois post-greffe (Ito et al. 2002 ; Shultz et al. 2005).

Le modèle TKO (Triple KO) réalisé uniquement dans un fond génétique C57BL/6 porte une mutation supplémentaire sur le gène CD47 murin (Lavender et al., 2013). Cette molécule exprimée de façon ubiquitaire à la surface des cellules interagit avec son ligand

SIRP α (Signal regulatory protein alpha) exprimé quant à lui sur les macrophages, les cellules dendritiques et les neutrophiles. L'engagement de ce récepteur avec son ligand inhibe la phagocytose de la cellule portant le CD47 via un mécanisme appelé le « don't eat me signal » (Oldenborg et al. 2000). La délétion du gène CD47 murin induit un état de tolérance dans la souris et les cellules ne présentant plus ce gène ne sont plus phagocytées (Wang et al. 2007). De plus, les souris DKO réalisées dans le fond C57BL/6 présentent un faible potentiel de reconstitution hématopoïétique qui est directement imputable à un défaut d'interaction entre le CD47 humain et le SIRP α murin (Kwant-Mitchell, Pek, Rosenthal, & Ashkar, 2009). En revanche, les souris DKO réalisées dans un fond NOD présentent de bonne prise de greffe de cellules humaines car le SIRP α murin peut interagir naturellement avec la molécule CD47 humaine (Takenaka et al., 2007).

La qualité de la reconstitution hématopoïétique chez les souris humanisées varie beaucoup d'un fond à l'autre. Dans l'ordre d'efficacité, le fond NOD est supérieur au fond BALB/c, lui-même supérieur au fond C57BL/6. Cette différence peut être attribuée au mécanisme de phagocytose résultant de l'absence d'interaction entre le SIRP α murin et le CD47 humain. Deux études ont montré que l'insertion du gène NOD SIRP α dans le fond C57BL/6 ou le fond BALB/C confère au souris des capacités identiques au fond NOD, en termes de reconstitution hématopoïétique (Legrand et al. 2011; Yamauchi et al., 2013). De plus, l'étude du Dr Legrand, montre également que les cellules souches hématopoïétiques humaines portant le gène murin CD47, ont un avantage sélectif et améliorent la prise de greffe.

Pour conclure, la délétion de deux ou trois gènes, permet de générer des souris profondément immunodéficientes. De plus, le fond génétique des souris affecte également leur capacité à soutenir une greffe de cellules humaines, mais ce problème peut être contourné via l'insertion du gène NOD codant pour la protéine SIRP α .

Nom de la lignée	Fond génétique	Mutations	Références
NS	NOD	Prkdc ^{scid}	(Mosier et al. 1990)
NSG	NOD	Prkdc ^{scid} Il2rg ^{tm1Wjl}	(Shultz et al. 2005)
NOG	NOD	Prkdc ^{scid} Il2rg ^{tm1Sug}	(Ito et al. 2002)
NRG	NOD	RAG1 Il2rg ^{tm1Sug}	(Shultz et al. 2008)
BRG	BALB/C	RAG1 ou RAG2 Il2rg ^{tm1Sug}	(Traggiai et al., 2004)
BRGS	BALB/C C57BL/6	RAG1 ou RAG2 Il2rg ^{tm1Sug} NOD SIRP α	(Legrand et al. 2011; Yamauchi et al., 2013)
TKO	C57BL/6	RAG2 Il2rg ^{tm1Wjl} CD47 ^{-/-}	(Lavender et al. 2013)

Tableau 2 : Fonds génétiques et mutations des souris immunodéficientes.

L'ensemble de ces mutations forme les lignées de souris immunodéficientes principalement utilisées pour générer des souris humanisées (tableau 2). Ces lignées à l'exception des souris NOD/SCID (NS) portent toutes deux mutations, une touchant le système de recombinaison VDJ (SCID /RAG1/RAG2) et une autre touchant le gène de la chaîne γ récepteur à l'IL-2 (Il2rg). Concernant cette dernière, il existe 2 mutations différentes où les NSG n'expriment plus la chaîne γ c (Cao et al., 1995) alors que les NOG/ BRG expriment une molécule dont le domaine de signalisation intracellulaire a été tronqué (Ohbo et al., 1996).

1.2.2 Souris humanisées et physiopathologie du VIH dans ces modèles

Le développement de souris humanisées a permis l'étude de nombreux pathogènes humains tels que des virus : le VIH, EBV, HCV, HBV, Ebola, la Dengue ; des bactéries : Borrelia, Salmonella ; ou encore des parasites : Plasmodium (revue dans (Shultz et al. 2012)).

Il existe différents types de souris humanisées et leur humanisation est dépendante du pathogène étudié. Dans notre cas, nous nous intéresserons principalement aux modèles permettant l'étude du VIH.

1.2.2.1 Humanisation par transfert adoptif de lymphocytes T

Historiquement, les premières souris humanisées ont été générées par greffe de PBMC humains dans des souris immunodéficientes (modèle PBL). Ce modèle présente l'avantage d'être facile à produire et de générer rapidement des lymphocytes T et B, une dizaine de jour post-greffe. Ces cellules diffusent dans l'organisme et on les retrouve dans la moelle osseuse, le foie, le poumon et la rate (King et al., 2009). De plus, ce modèle est capable de monter une réponse T cytotoxique suffisante pour induire un rejet de greffe (Racki, Covassin, Brehm, & Pino, 2010) et de produire des anticorps (Donald et al. 1988), (Carlsson et al. 1992). Cependant, ce modèle souffre d'un gros défaut puisque les cellules humaines sont également capables de monter une réponse contre les cellules de l'hôte générant une maladie du greffon contre l'hôte (xéno-GVHD) (King et al., 2009). La GVHD entraîne la mort de la souris en quelques semaines après la greffe, imposant une fenêtre d'étude assez courte.

Ce modèle PBL a été un des premiers modèles de souris humanisées utilisé pour l'étude du VIH (dans le fond des souris NS)(Mosier et al. 1990). Il a été ensuite reproduit dans différents fonds génétiques de souris : NSG (P. Kumar, Ban, Kim, & Wu, 2008) ; DKO (Volk et al., 2012). Les souris PBL sont susceptibles à l'infection par le VIH et on observe une délétion massive des lymphocytes T CD4 corrélée avec une forte augmentation de la charge virale. Il est très utilisé dans des stratégies de thérapies géniques car il permet de mimer une approche thérapeutique dans les lymphocytes T.

1.2.2.2 Humanisation par greffe de cellules souches humaines

La seconde approche pour générer des souris humanisées consiste à greffer des cellules souches hématopoïétiques humaines (CSHh) associées à un conditionnement pré-greffe. Ce type de greffe permet de générer en quelques mois différentes populations cellulaires humaines dans la souris comme des lymphocytes T, des lymphocytes B, des cellules NK, des cellules dendritiques et des macrophages. Dans le thymus de ces souris, on observe des lymphocytes T CD4, des lymphocytes T CD8 ainsi que des cellules doubles positives CD4/CD8. La présence de cette dernière population cellulaire suggère une thymopoïèse humaine dans le thymus murin et confirme que les lymphocytes T sont générés à partir des précurseurs hématopoïétiques initialement greffés. De plus, des analyses immuno-

histologiques révèlent également la présence de quelques lymphocytes T humains dans l'intestin (Ito et al. 2002 ; Shultz et al. 2005). La greffe de CSHh peut être réalisée chez des animaux adultes comme chez des nouveau-nés bien que la prise de greffe soit meilleure chez les nouveau-nés (Brehm et al., 2010). Dans ces modèles, le système immunitaire humain ainsi généré présente des lacunes en termes de fonctionnalité. En effet, dans ces souris, il y a un manque de production de certaines cytokines humaines ainsi qu'un défaut de production d'Ac, principalement d'IgG traduisant une mauvaise coopération entre les LT et les LB (Shultz et al. 2007). Une étude réalisée dans les souris NSG a démontré qu'un conditionnement pré-greffe au Busulfan (agent alkylant) améliore modestement bien que significativement la production d'IgM et d'IgG. Cependant les IgG sont toujours présentes en faible concentration (Choi et al., 2011).

Les fonds NSG, NOG et NRG greffés avec des CSH humaines (NSG-Hu, NOG-Hu, NRG-Hu) sont trois modèles très similaires. Ces modèles présentent un faible niveau d'humanisation au niveau des muqueuses intestinales en comparaison avec d'autres modèles de souris humanisées comme les souris BLT (développées dans le chapitre suivant) (Denton et al., 2012). Ces souris ne sont probablement pas susceptibles à l'infection par ces voies et l'absence d'étude démontrant le contraire semble le confirmer. En revanche, après une injection du VIH par la voie intrapéritonéale ou intraveineuse, on observe une délétion des lymphocytes T CD4 en périphérie corrélée avec une augmentation de la charge virale (Watanabe et al. 2007 ; Gorantla et al. 2010 ; Walker et al., 2012). De plus, ces souris sont capables de monter une réponse cellulaire spécifique dirigée contre le VIH (Gorantla et al., 2010) ainsi qu'une réponse humorale dirigée contre les protéines virales gp120 et p24 dans les groupes infectés avec de fortes doses virales (Watanabe et al. 2007).

Les modèles BRG greffés avec des CSH humaines (BRG-Hu) permettent comme les modèles précédents une bonne reconstitution en cellules humaines. En revanche, ce qui les différencie des modèles NSG, NOG et NRG est leur capacité à être infectés par les muqueuses, vaginales ou rectales. De plus, l'infection entraîne également une délétion des lymphocytes T CD4 (Berges et al. 2008; Akkina et al., 2011).

1.2.2.3 Humanisation par greffe de cellules souches humaines associée à des tissus humains

Le modèle BLT (Bone Liver Thymus) basé sur les travaux de McCune a été développé en parallèle par deux équipes en 2006. Ces souris BLT sont générées par greffe de foie fœtal et de thymus fœtal associées à une greffe de CSHh dans un fond NOD/SCID. Il a

été montré que la greffe de cellules CD34⁺ améliore significativement la reconstitution des cellules humaines dans les BLT en comparaison au modèle thymus, foie seuls. Ces souris présentent également l'avantage d'avoir un système immunitaire plus fonctionnel que dans les autres modèles décrits précédemment. En effet, elles sont capables de monter une réponse effectrice associée avec une sécrétion de cytokine ainsi qu'une forte production d'Ac, IgM et IgG (Melkus et al., 2006), (Lan, Tonomura, Shimizu, Wang, & Yang, 2006). Le modèle BLT a malgré tout un défaut majeur, puisque les souris développent une sévère GVHD à partir de la douzième semaine post-reconstitution corrélée avec une mortalité vers la quinzième semaine. Ces souris présentent entre autres des atteintes cutanées et des colites, associées à des infiltrats de lymphocytes T dans la peau et dans la lamina propria de l'intestin. De plus, il n'y a pas de différence significative concernant la gravité des symptômes quand ce modèle BLT est réalisé dans un fond NS ou dans un fond NSG (Greenblatt et al., 2012). En revanche le modèle BLT réalisé dans un fond TKO ne déclare plus du tout de symptôme de GVH même après 29 semaines post-greffe, bien que ce dernier présente une très bonne reconstitution hématopoïétique dans le sang, la rate, les ganglions mésentériques et dans des tissus comme l'intestin (Lavender et al., 2013).

Le modèle BLT généré dans un fond NS, NSG, ou TKO, présente de très bonne prise de greffe dans l'intestin et le vagin, favorisant l'infection par le VIH via les muqueuses. De plus, l'augmentation de la charge virale corrèle avec une délétion des lymphocytes T CD4⁺ dans le sang périphérique, l'intestin, le colon ainsi que les ganglions mésentériques. On retrouve également dans ces souris une production d'IgG dirigées spécifiquement contre des protéines virales (Sun et al. 2007). De plus, ce modèle permet une réponse cellulaire spécifique dirigée contre des protéines virales Gag, Nef, Env et Pol (Brainard et al. 2009) (Lavender et al., 2013).

Le développement des modèles BLT en routine est impossible en France, car l'obtention de matériel biologique d'origine fœtal est très complexe.

1.2.3 Optimisation des souris humanisées par insertion de gènes humains

Ces dernières années des nouvelles souris transgéniques ont été développées pour améliorer encore l'humanisation, autant en termes de reconstitution hématopoïétique, qu'en termes d'efficacité de la réponse immune. Ces améliorations se traduisent par l'introduction de gènes humains dans les différents fonds immunodéficients.

1.2.3.1 Insertion des gènes HLA humains

Le défaut de fonctionnement des LT et des LB dans des modèles de souris humanisées, autre que le modèle BLT, a été imputé à un défaut de molécules du HLA humain (Human leucocyte Antigens) dans le thymus murin. L'introduction du gène codant pour le HLA A2 (Complexe Majeur d'Histocompatibilité de classe I) permet la production de cytokines comme l'IFN- γ (Interféron γ) en réponse à une infection à EBV (Epstein-Barr virus) et le développement de LT matures fonctionnels restreints au HLA-A2 (Shultz et al. 2010). Une autre étude, dans laquelle un gène du CMH de classe II (DR1) est introduit dans une souris immunodéficiente (Suzuki et al., 2012) montre une augmentation de la production d'Ac IgM et IgG après humanisation. Des modèles de souris NSG doublement déficientes pour les molécules du CMH murins ont été rapportés (Pino et al., 2010). L'introduction des molécules HLA dans ce fond pourrait générer les modèles de souris humanisées plus performants. Néanmoins, la manipulation du génome de ces souris, couplée à leur immunodéficiences profondes, n'est pas sans conséquence sur leur fertilité et sur leur état de santé.

1.2.3.2 Insertion des gènes de cytokines humaines

La reconstitution hématopoïétique a été encore améliorée après l'introduction de cytokines humaines (IL-3, IL-4, IL-7, IL-15, GM-CSF, TPO) dans ces souris humanisées. Ces cytokines peuvent être soit injectées de façon régulière, soit elles peuvent être produites directement par la souris suite à l'introduction de leurs gènes (Willinger, Rongvaux, Strowig, Manz, & Flavell, 2011). L'humanisation de l'allèle murin, technique consistant à remplacer le gène murin par son homologue humain, permet une expression physiologique d'une cytokine (knock-in). Par exemple, l'introduction du gène TPO humain dans le fond BRG permet un meilleur auto-renouvellement et une fonction améliorée des CSH humaines (Rongvaux et al., 2011). Classiquement, certaines cellules humaines sont déficientes dans les modèles de souris humanisées, comme les monocytes, les macrophages et les cellules NK. Dans un fond BRG, l'introduction des gènes codant pour les quatre cytokines : M-CSF, IL-3/GM-CSF et TPO, en remplacement de leurs homologues murines, permet de favoriser la production de ces cellules. Ces nouvelles souris dénommées MITRG ou MISTRG, si elle possède en plus le gène humain SIRP α , permettent une prise de greffe supérieure en comparaison au modèle NSG-Hu. Ces souris sont un excellent modèle de souris humanisées car l'ajout de ces cytokines permet

d'améliorer l'immunité innée bien qu'elle n'améliore pas les fonctions de l'immunité adaptative (Rongvaux et al., 2014).

Le choix du modèle de souris humanisées va reposer sur la question scientifique posée et sur l'accessibilité du modèle. En effet, toutes ces souris ne sont pas encore commercialisées et des restrictions au niveau de la propriété intellectuelle empêchent leur diffusion dans la communauté scientifique au-delà des collaborations. Le développement de stratégies vaccinales a plus de chance d'aboutir dans le modèle BLT, en raison de la bonne fonctionnalité des cellules humaines dans ce modèle. Des stratégies ciblant l'entrée du virus au niveau des muqueuses pourront être développées dans les modèles BLT ou BRGS, les seuls ayant fait la preuve de leur susceptibilité à l'infection par voie mucosale. Les autres modèles ne sont pas pour autant inutiles, car ils ont l'avantage d'être plus s à générer que le modèle BLT. Les NSG /NOG sont de très bons modèles pour des stratégies de thérapies géniques, si celles-ci ne dépendent pas de la réponse immunitaire.

2 La vaccination VIH

2.1 Etat des lieux des essais cliniques de phase IIb et III

Le nombre de nouveaux cas d'infections par le VIH dans le monde continue de chuter, représentant une baisse de 33% depuis 2001 grâce à la généralisation de la trithérapie. Bien que ces chiffres soient très encourageants, on enregistre encore 2,3 millions de nouvelles infections en 2012 (UNAIDS, 2013). Le développement d'un vaccin préventif permettrait de diminuer encore le nombre de nouvelles infections et pourrait contribuer à l'éradication du virus à long terme. Il y a eu de nombreux essais cliniques vaccinaux depuis le début de la pandémie, regroupant près de 44 000 volontaires sains dans plus de 187 essais (Excler et al. 2013) et jusqu'à ce jour un seul a montré une efficacité, bien que très modeste. Ces résultats montrent la limite des modèles de PNH car certains vaccins très immunogéniques dans ces modèles n'ont généré chez l'Homme qu'une faible réponse immune (Morgan et al. 2008). Les corrélats de protection en termes de réponse immunitaire ne sont d'ailleurs toujours pas clairement établis.

Le même candidat vaccin a été testé dans les essais HVTN 502 et HVTN 503 se déroulant respectivement en Amérique, Caraïbes et Australie pour le premier et en Afrique du sud pour le second. Ce candidat était un vecteur adénoviral de type 5 déficient portant 3 gènes du VIH : *gag*, *pol* et *nef*. Les volontaires ont reçu 3 injections, une le premier jour, une à la semaine 4 et la dernière à la semaine 26 (Buchbinder et al., 2008) (Gray et al., 2011). L'essai

HVTN 505 reposait sur le principe du prime/boost permettant d'augmenter la réponse cellulaire et humorale. Le prime consistait en trois injections, le premier jour, à la semaine 4 et à la semaine 8, d'ADN circulaire portant les gènes *gag*, *pol*, *nef* et *env*. Le boost consistait en une injection du vecteur adénoviral exprimant une protéine de fusion Gag-Pol et les glycoprotéines d'enveloppes à la semaine 24 (Hammer et al., 2013). Ces trois essais ont dû être arrêtés prématurément, car les volontaires injectés avec le candidat vaccin et possédant une immunité préexistante dirigée contre l'adénovirus de type 5 (Ad5), présentaient un risque accru de contracter le VIH. L'hypothèse selon laquelle ces individus présentaient des niveaux d'activation des lymphocytes T CD4 élevés, créant ainsi un terrain favorable pour l'infection pour le VIH, a été invalidée (O'Brien et al., 2009). En revanche, une autre étude montre *in vitro*, que des Ac neutralisant anti Ad5, induiraient la maturation des cellules dendritiques et faciliteraient la transmission du virus des cellules dendritiques aux lymphocytes T (Perreau et al. 2008)

D'autres approches développées dans les essais cliniques Vax003 et Vax004, visaient à injecter des cocktails de gp120 recombinantes portant des antigènes viraux adjuvantés avec de l'alum, pour induire la production d'Ac neutralisants. Dans ces études, les auteurs visent deux phénotypes viraux différents. Le type 1 est considéré comme facilement neutralisable car il conserve les épitopes de la gp120 reconnus par des Ac. En revanche le type 2 a perdu ces épitopes par pression de sélection et reste beaucoup plus dur à neutraliser. Le postulat actuel est qu'une stratégie vaccinale qui induirait des Ac neutralisants contre le type 2 aurait beaucoup plus de chance d'être efficace. Malheureusement, ces deux essais n'ont montré aucune protection dans la transmission et aucun effet sur la charge virale bien que les volontaires traités présentaient des concentrations d'Ac neutralisants, dirigés contre le type 1 seulement, supérieures aux volontaires placebo (Pitisuttithum et al., 2006) (Gilbert et al., 2010).

Tous ces essais ne visaient plus à démontrer la sécurité de l'approche mais son efficacité contre le VIH, en influant sur la transmission du virus et sur la charge virale. Les stratégies visant à induire une réponse cellulaire (HVTN 502, 503 et 505) ou celles visant une réponse humorale (Vax 003 et 004) ont toutes échoué. Seul l'essai de phase III RV144, détaillé dans la partie suivante a montré une efficacité contre le VIH.

2.2 L'essai RV144

L'essai de phase III RV144 s'est déroulé en Thaïlande sur près de 16 000 volontaires sains. La stratégie développée pour cet essai visait à induire une réponse cellulaire et

humorale. Le prime, nommé ALVAC-VIH, consistait en 4 injections, une le premier jour de l'étude, une à la semaine 4, une à la semaine 12 et la dernière à la semaine 24, d'un canarypox virus recombinant permettant l'expression des protéines Gag et protéase du VIH-1 associées à une protéine de fusion de la gp120 et de la partie transmembranaire de la gp41. Le boost, AIDSVAX B/E, consistait quant à lui à deux injections, une à la semaine 12 et une à la semaine 24, d'un mélange de deux glycoprotéines recombinantes (gp120) issues de deux sous-types différents de VIH formulées dans l'adjuvant d'alum (Rerks-Ngarm et al. 2009).

Cet essai a montré pour la première fois qu'une stratégie vaccinale pouvait diminuer l'incidence du VIH d'environ 30% (fig 9). Bien que son efficacité ait diminué après la première année et que le vaccin soit plus efficace dans les populations à faible risque. Il faut noter également que les lymphocytes T des individus vaccinés produisent de l'INF γ lorsqu'ils sont en contact avec des antigènes de Gag / Env. Le taux de réponse, mesuré par la production d'IL-2 et d'interféron- γ des lymphocytes T CD4 spécifiques d'Env est supérieur dans le groupe vacciné comparé au groupe placebo. De plus, presque tous les individus vaccinés possèdent des Ac reconnaissant la gp120 des deux sous-types de virus et environ 50% possèdent des Ac dirigés contre la p24. Malgré cette constellation de réponses cellulaires et humorales, les auteurs ne s'expliquent pas l'absence d'efficacité sur la charge virale dans le groupe vacciné infecté (Rerks-Ngarm et al. 2009). Une autre étude exploitant les résultats de l'essai émet l'hypothèse que des IgG spécifiques des régions variables V1 et V2 de la gp120 participeraient à la protection, alors que des IgA spécifiques de l'enveloppe diminueraient cette protection. En effet, les auteurs observent une corrélation inverse entre les niveaux sériques d'IgG spécifiques de V1 /V2 et le taux d'infection, ainsi qu'une corrélation directe avec les niveaux sériques d'IgA et le taux d'infection (Haynes et al. 2012).

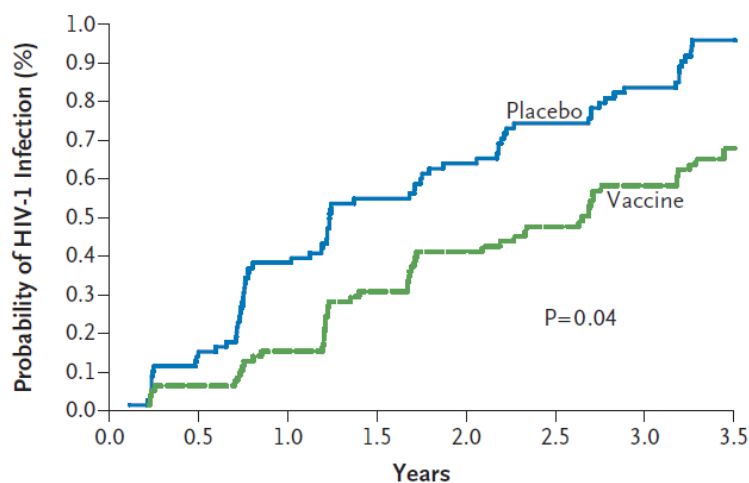


Figure 9 : Résultats de l'essai RV144 sur l'incidence du VIH. Extrait de Rerks-Ngarm et al New England 2009.

2.3 Les futures stratégies vaccinales

De nombreux enseignements ont été tirés des précédents essais cliniques et vont modifier les stratégies vaccinales futures. L'essai RV144 a démontré l'intérêt d'IgG sériques ciblant les régions V1 et V2 de la gp120 et le rôle potentiellement délétère d'IgA sériques. Trois essais cliniques de phase I utilisant les vaccins candidats de l'essai RV144 vont permettre d'approfondir les rôles précis de ces Ac ainsi que la réponse immunitaire muqueuse induite par ces vaccins. Cinq autres essais prévus sont basés sur l'injection de protéines recombinantes de l'enveloppe adjuvantes seule ou utilisée comme boost, associées avec des primes d'ADN ou de vecteurs viraux portant des gènes du VIH. Tous ces essais vont également mesurer l'impact de la vaccination sur la production d'Ac dirigés contre Env associée à une réponse cellulaire (Excler et al., 2013).

3 Thérapie cellulaire du VIH, le patient de Berlin

Après 30 années de recherche sur le VIH et des millions d'individus infectés on ne connaît qu'un seul cas avéré de guérison. Ce cas isolé est connu sous le nom du Patient de Berlin. Ce patient (Timothy Brown) a été diagnostiqué pour une leucémie myéloïde aiguë plusieurs années après avoir été infecté par le VIH et pour lutter contre cette nouvelle maladie, il a débuté une chimiothérapie. Les traitements ARV ont été arrêtés car, associés à la chimiothérapie, ils entraînaient une sévère toxicité hépatique. Comme attendu, un rebond de la charge virale a été observé chez le patient dès l'arrêt des antirétroviraux (fig 10). Une fois le traitement ART restauré, la charge virale a rapidement chuté sous un seuil indétectable. Sept mois après le premier diagnostic le patient a rechuté pour la leucémie qui fut cette fois traitée par une greffe de précurseur hématopoïétique CD34⁺ portant une mutation homozygote delta 32 sur le gène CCR5. Ce patient étant lui-même hétérozygote pour cette mutation. Un jour avant la greffe de cellules souches hématopoïétiques (CSH), le traitement HAART a été totalement interrompu et on n'observe aucun rebond de la charge virale depuis l'arrêt du traitement. En revanche, il y a une augmentation progressive du nombre de CD4 dans le sang (fig 10). Parallèlement à ces résultats les réponses immunitaires cellulaires et humorales dirigées contre le VIH ont également chuté (Hütter et al. 2009).

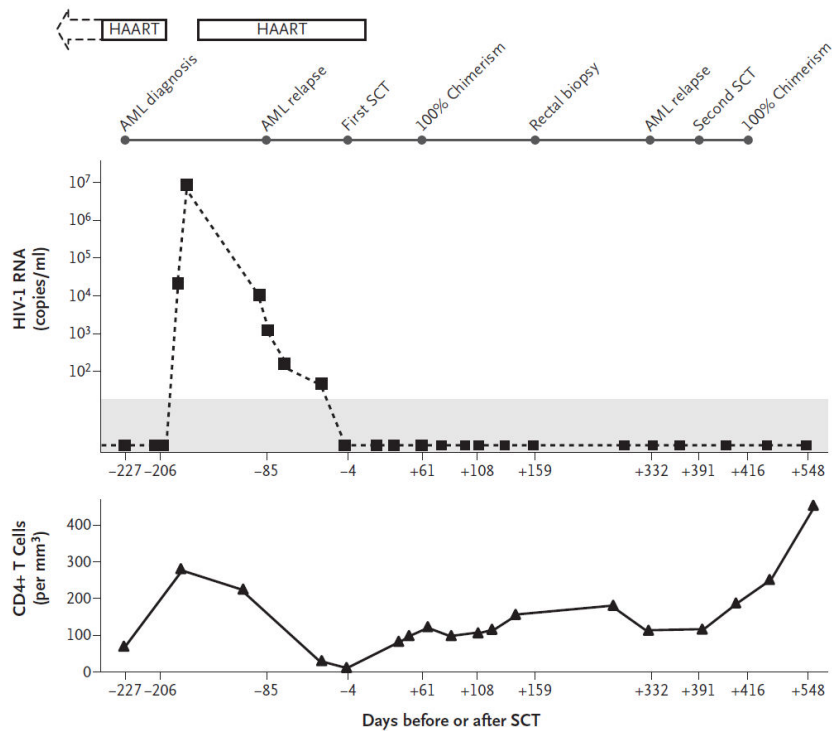


Figure 10 : Cinétique thérapeutique du Patient de Berlin associée à la charge virale plasmatique et du nombre de CD4 dans le sang. Extrait de Hütter *et al*, The New England Journal of Medicine, 2009.

Deux années après la greffe, le patient présente toujours une prise de greffe parfaite. Une biopsie du colon montre que les lymphocytes TCD4 présents dans ces muqueuses sont tous issus du donneur. De plus, le virus reste toujours indétectable que ce soit dans le plasma (ARN) ou sous forme intégré dans les PBMC (ADN proviral). Finalement, la réponse humorale disparaît progressivement car les Ac dirigés contre la p17 et la p24 ont complètement disparu et ceux dirigés contre la gp120 et la gp41 continuent de diminuer (Allers *et al.*, 2011).

Le cas du Patient de Berlin est la preuve que l'on peut éradiquer le virus d'un individu infecté. Cependant, ce cas reste isolé car la fréquence d'individu portant la mutation $\Delta 32$ est faible et la probabilité de trouver un donneur compatible portant cette mutation est encore plus faible. Ces dernières années, les outils de transfert de gènes ont beaucoup évolué et il est actuellement possible de mimer le phénotype $\Delta 32$ ou d'insérer des gènes anti-VIH dans des CSH comme dans des lymphocytes. Il est donc permis de penser que les approches de thérapies géniques pourraient avoir un rôle à jouer dans la guérison du VIH. A tout le moins, la thérapie génique de l'infection par le VIH a pour ambition d'aboutir à un contrôle de la

charge virale et une protection des lymphocytes T CD4 et de la capacité immunitaire pour que les patients puissent arrêter le traitement HAART.

4 Thérapie génique

4.1 Généralités

La thérapie génique consiste à introduire une version saine d'un gène ou un nouveau gène dans une cellule, dans le but de corriger un gène déficient ou de conférer de nouvelles propriétés à une cellule. Cette approche thérapeutique est relativement récente et on comptait environ 1800 essais cliniques terminés ou en cours en 2012 (Ginn et al. 2013). Les premiers succès du début du XXI^e siècle ont démontré l'efficacité de la thérapie génique dans le traitement d'une maladie génétique, l'immunodéficience sévère combinée liée à l'X (SCID X1) (Cavazzana-Calvo et al. 2000; Hacein-Bey-Abina et al. 2002). Cette maladie affecte le développement des lymphocytes T et des NK suite à une mutation sur le gène γ de la chaîne commune des récepteurs aux cytokines et l'intégration d'une copie fonctionnelle de ce gène a permis de restaurer les lymphocytes T et NK chez les patients. Aujourd'hui, la thérapie génique n'est pas restreinte aux maladies génétiques. En effet sur l'ensemble des essais cliniques réalisés en 2012 seulement 8,9% ciblaient des désordres génétiques. Elle trouve des applications dans d'autres champs médicaux tels que des stratégies anti-cancéreuses, des maladies infectieuses ou encore des maladies cardiovasculaires représentant respectivement 63,8%, 8,2% et 8,1% des essais cliniques de thérapies géniques (fig 11). Dans les chapitres suivant, nous allons nous intéresser principalement à l'utilisation de la thérapie génique pour combattre l'infection par le VIH.

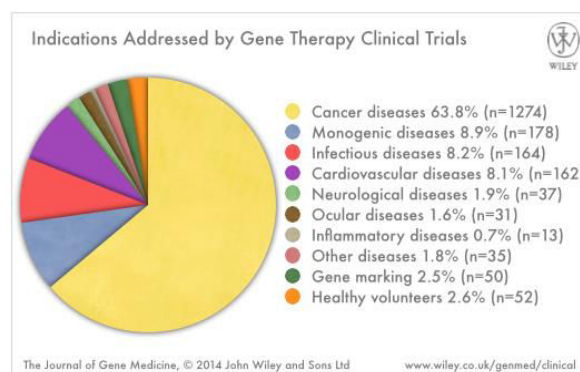


Figure 11 : Pathologies traitées en essais cliniques par thérapie génique. Extrait de Ginn et al. The Journal of Gene Medecine, 2013.

4.2 Thérapie génique de l'infection par le VIH

4.2.1 Les vecteurs de transfert de gènes

Un vecteur viral est un virus modifié dans lequel on a retiré les gènes viraux pour les remplacer par un ou plusieurs gènes d'intérêt thérapeutique. Toutefois, ces vecteurs conservent une propriété que les virus ont acquise durant l'évolution, à savoir le transfert de matériel génétique dans une cellule hôte. Il existe différents types de vecteurs possédant chacun des caractéristiques tirées du virus dont ils sont issus comme la taille du génome à transférer, la susceptibilité à la transduction de la cellule cible ou encore l'intégration ou non du génome viral dans l'ADN de la cellule cible. Le choix du vecteur se fait donc en accord avec toutes ces caractéristiques et les modalités imposées par la question scientifique.

Les principaux vecteurs utilisés en thérapie génique VIH sont issus de quatre virus : les adénovirus, les Virus adéno-associés (AAV), les rétrovirus et les lentivirus. Ces quatre types de vecteurs sont aujourd'hui très utilisés dans les laboratoires et peuvent être produits à des titres élevés. La délétion des certains gènes viraux nécessite lors de la production des vecteurs l'ajout de protéines accessoires telles que les protéines d'enveloppe ou de capside (fig 12) (Verma et al. 2005).

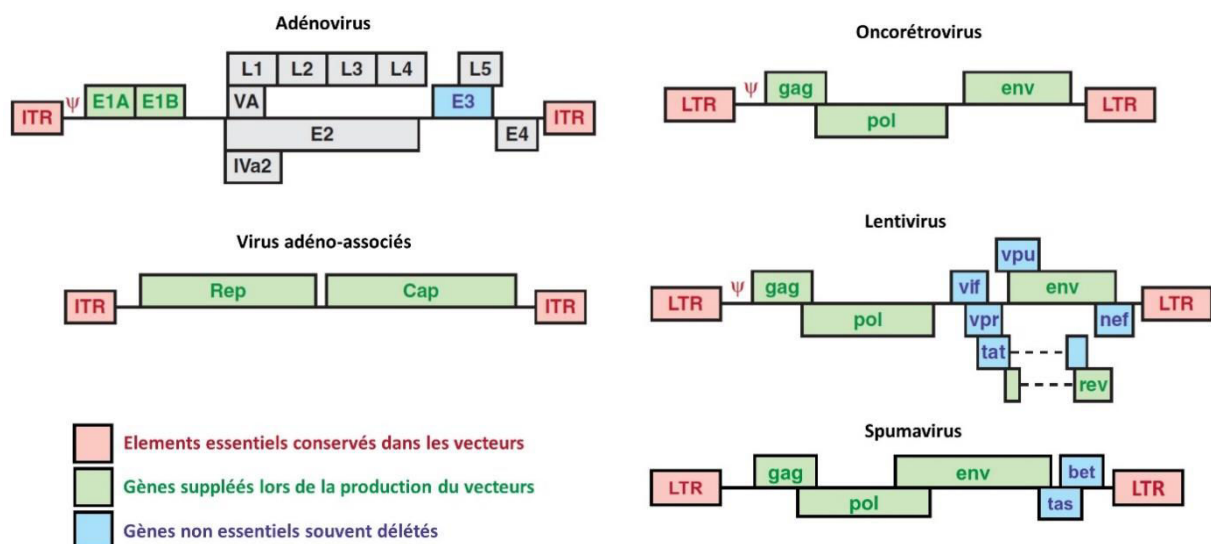


Figure 12 : Schéma des génomes des principaux virus utilisés en thérapie génique. D'après Verma et al ; Annual review of biochemistry ; 2005.

4.2.1.1 Adénovirus

Les adénovirus sont des virus non enveloppés possédant un génome à ADN double brin de 35 Kb codant pour plus de 50 protéines différentes (Imler et al. 1995). Ces virus ont la possibilité d'infecter des cellules en cycle ou non et sont non intégratifs. Les deux premières générations de vecteurs dérivés d'adénovirus conservaient des protéines virales facilitant leur production *in vitro* mais étaient par la même occasion fortement immunogène. La dernière génération ne possède plus aucun gène viral et peut par conséquent transférer un transgène de 28 à 32 kb. Toutefois la production de ces vecteurs nécessite la présence d'un virus *helper*, défectif pour l'encapsidation, permettant la synthèse des protéines virales, difficile à éliminer totalement lors de la purification du vecteur (Palmer et al. 2005).

4.2.1.2 Virus adéno-associés (AAV)

Les AAV sont des virus à ADN simple brin non enveloppés possédant un génome de 4,7 Kb. Ces virus tirent leur nom de leur incapacité à se répliquer seul et nécessitent la présence d'un virus *helper* (adénovirus). Dans la grande majorité des cas, les AAV comme les adénovirus, sont non-intégratifs et restent dans le noyau de la cellule sous forme épisomale. L'intégration dans le génome de la cellule hôte se fait à un site préférentiel dans le chromosome 19 et reste un évènement rare car seul 0,1% des particules infectieuses s'intègrent (McCarty, et al. 2004). Les vecteurs dérivés des AAV possèdent de nombreux avantages car ils sont non pathogènes pour l'Homme, la grande diversité de sérotypes leurs confèrent la possibilité d'infecter de nombreux types cellulaires. Bien que faiblement immunogènes, beaucoup d'individus possèdent naturellement des Ac neutralisants contre ces virus et préférentiellement dirigés contre les sérotypes 1 et 2. Malgré la présence d'Ac dirigés contre ces sérotypes, les stratégies utilisant ces AAV-1 et 2 semblent malgré tout efficace (Smith et al. 2013; MacLaren et al. 2014). Cependant pour diminuer le risque de neutralisation par des Ac déjà présents, une équipe a construit une capsid chimère AAV-1 et 2 moins sensible à ces Ac neutralisants (Bowles et al., 2012). Finalement, leur principal défaut est la petite taille du transgène qu'ils peuvent transférer (5 Kb) (Skubis-Zegadło et al. 2013).

4.2.1.3 Rétroviridae

La première caractéristique de cette famille de virus repose sur leur génome comprenant deux copies d'ARN simple brin à polarité ⁺. Les trois principaux gènes de ces virus sont les gènes *gag*, *pol* et *env* codant respectivement pour des protéines de la capsid, les

enzymes de réplication et les protéines d'enveloppe (fig 12). Ces gènes viraux sont encadrés par deux LTR (Long Terminal Repeat), qui sont des séquences régulatrices (promoteur enhancer) permettant la transcription du génome viral. Les protéines d'enveloppe définissent quant à elles le tropisme du virus et les mécanismes de réplication virale sont identiques de ceux du VIH. Après la fusion du virus avec la cellule hôte, le matériel génétique du virus est libéré de la capsid, rétrotranscrit d'ARN en ADN, exporté vers le noyau et intégré dans le génome de la cellule. Cette famille comporte plusieurs genres viraux, comme les spumavirus, les oncorétrovirus et les lentivirus, et de nombreuses stratégies de transfert de gènes reposent sur des vecteurs dérivés de ces virus.

4.2.1.3.a Spumavirus

Les spumavirus ou *foamy virus* sont des rétrovirus possédant une caractéristique assez inhabituelle pour cette famille de virus car il semblerait que les étapes de transcription inverse se dérouleraient entre les étapes d'encapsidation de l'ARN viral et de bourgeonnement du virus. Cette caractéristique entraîne la formation de virions possédant de l'ADN comme matériel génétique. Toutes les étapes du cycle viral de ce virus ne sont pas encore totalement élucidées. Ce virus n'est pas pathogène pour l'Homme, sauf quelque rare cas bénins de zoonoses, et peut infecter des cellules en cycle bien que des formes non intégratives soient très stables dans des cellules quiescentes. Les vecteurs dérivés de ces virus sont de bons candidats pour des stratégies de thérapies géniques anti-VIH car en plus d'avoir une bonne efficacité de transduction dans des CSH, leur production ne sera pas altérée par des transgènes anti VIH ciblant la synthèse protéique ou l'encapsidation (Olszko et al. 2013) (Linial et al. 1999).

4.2.1.3.b Oncorétrovirus

Les oncorétrovirus regroupent de nombreux type de virus comme le virus lymphotropique humain de type I (HTLV-I), le virus de la leucémie murine (MLV), le virus de la leucémie bovine (BLV), le virus de la leucémie féline (FLV) etc. Tous ces virus sont responsables chez l'Homme et l'animal de lymphomes et de leucémies chez les sujets infectés. Ces virus ne possèdent pas la capacité de passer la membrane nucléaire des cellules quiescentes et ne peuvent donc s'intégrer que dans les cellules en division (Roe, Reynolds, Yu, & Brown, 1993). L'intégration du génome viral semble se faire préférentiellement dans des sites actifs de la chromatine, en amont et en aval des sites d'initiation à la transcription (Wu, Li, Crise, & Burgess, 2003). Les LTR peuvent initier la transcription d'oncogène voisin

du site d'intégration et induire une prolifération anarchique des cellules transduites. Ce mécanisme appelé mutagenèse insertionnelle est responsable de leucémie, pour quatre des neuf patients traités par thérapie génique pour le syndrome de l'immunodéficience sévère combinée lié à l'X, suite à l'activation non contrôlée du gène *LMO-2* par les séquences régulatrices du vecteur MLV utilisé (Hacein-Bey-Abina et al., 2010). Un autre essai clinique de thérapie génique utilisant un oncorétrovirus, visait à traiter un désordre immunitaire : le syndrome de Wiskott-Aldrich. Dans ce dernier, sept patients sur dix ont développés une leucémie directement en lien avec les sites d'insertions du vecteur (Braun et al., 2014). Les vecteurs dérivés des oncorétrovirus ne semblent pas être les meilleurs candidats pour des applications thérapeutiques suite aux forts risques oncogéniques associés et leur restriction à transduire seulement les cellules en cycle.

4.2.1.3.c Lentivirus

Il existe également de nombreux virus appartenant à ce genre ; le virus de l'immunodéficience humaine (VIH), le virus de l'immunodéficience féline (FIV) ou encore le virus de l'immunodéficience simien (VIS) sont les plus connus. Le génome des lentivirus est plus complexe que celui des rétrovirus type MLV car il possède, en plus des gènes *gag*, *pol* et *env*, des gènes de régulation *tat* et *rev* et des gènes codant pour des protéines accessoires, variables d'un lentivirus à un autre. Contrairement aux autres rétrovirus, les lentivirus ont la possibilité d'intégrer leur génomes dans des cellules quiescentes (Lewis et al. 1994). Cette propriété confère aux vecteurs dérivés des lentivirus un avantage majeur pour les stratégies de transfert de gènes *in vivo* (Naldini et al., 1996). Les vecteurs dérivés du VIH sont la plupart du temps pseudotypés avec les glycoprotéines G d'enveloppe du virus de la stomatite vésiculaire (VSV-G) (Kay et al. 2001). Ces protéines confèrent aux particules lentivirales un tropisme très large, car elles reconnaissent les récepteurs membranaires des LDL (Low Density Lipide) très largement répandu à la surface des cellules (Finkelshtein, Werman, Novick, Barak, & Rubinstein, 2013).

La production de vecteur dérivé du VIH est assurée dans une lignée trans-complémentante (HEK 293T) permettant l'apport des protéines virales car la grande majorité des gènes viraux ont été supprimés du vecteur (fig. 12).

-La première génération de vecteurs lentiviraux est produite par une triple co-transfection avec le plasmide d'intérêt, le plasmide codant pour les protéines de la capsid et de la polymérase, appelé packaging et le plasmide codant pour les protéines d'enveloppes. Le gène *env* et une partie de la séquence d'encapsidation ψ ont été éliminés du plasmide

packaging. La séquence LTR en 5' a été remplacée par le promoteur du cytomégalovirus humain (hCMV) assurant l'expression des gènes *gag* et *pol*. La séquence LTR en 3' a été quant à elle remplacé par une séquence de polyadénylation. L'expression des protéines d'enveloppe est assurée par un second plasmide portant le gène *env* en aval du promoteur hCMV. Le troisième plasmide portant le gène d'intérêt conserve les séquences LTR en 5' et en 3' ainsi que toutes les autres séquences permettant l'encapsidation, la rétrotranscription et l'intégration (fig. 13) (Naldini et al., 1996). Le fractionnement des gènes viraux sur plusieurs plasmides permet d'éliminer les risques de recombinaisons homologues recréant un virus sauvage répliquatif (RCL : Replication Competent Lentivirus).

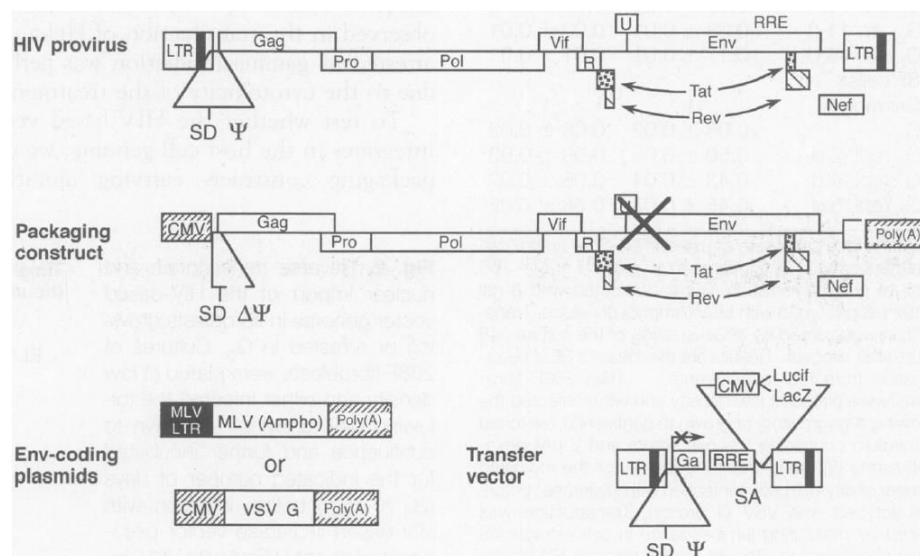


Figure 13 : représentation schématique des plasmides permettant la production de vecteurs lentiviraux de première génération. Extrait de Naldini et *al* Science 1996.

-La seconde génération de ces vecteurs permet l'élimination des gènes codant pour les protéines accessoires : *vif*, *vpr*, *vpu* et *nef* dans le plasmide packaging.

-La troisième génération vise à améliorer toujours plus la sécurité de ces vecteurs en éliminant le gène *tat* du plasmide packaging. *Tat* est un activateur de la transcription qui permet d'augmenter la production de transcrite à partir du LTR 5'. L'élimination de ce gène entraîne une forte diminution de la transcription et pour compenser cette perte le LTR 5' est remplacé par un promoteur fort, le promoteur du virus du sarcome de Rous (RSV), fusionné avec les régions R et U5 du LTR 5'. Le gène codant pour la protéine Rev a également été éliminé du vecteur packaging. Cette protéine se fixe sur les séquences RRE des ARN codant pour les protéines virales (*gag/pol*) et les ARN du vecteur d'intérêt, permettant leur

translocation dans le cytoplasme où ils seront respectivement traduits et encapsidés. La protéine Rev reste indispensable pour la production d'un vecteur fonctionnel et il est donc apporté par un quatrième plasmide lors de la co-transfection. Finalement, la dernière modification réalisée est l'élimination complète de la séquence ψ dans le vecteur packaging (Dull et al., 1998).

4.2.2 Cibles thérapeutiques

Le principal objectif de la thérapie génique anti-VIH consiste à générer des lymphocytes T CD4 résistants à l'infection en ciblant des protéines virales ou humaines impliquées dans les différentes étapes du cycle viral.

4.2.2.1 La fusion

L'infection d'une cellule par le VIH passe par l'implication du récepteur CD4 et d'un corécepteur, le CCR5 ou le CXCR4. La molécule du CD4 joue un rôle trop important dans le système immunitaire pour que l'on puisse altérer son expression sans risque. Cependant dans les années 1990, des molécules solubles du CD4 utilisés comme leurres pour piéger le VIH avant qu'il ne puisse infecter sa cellule cible. Ces molécules ont montrées une bonne activité anti VIH *in vitro* mais se sont avérées inefficace chez les patients (Daar, Li, Moudgil, & Ho, 1990). En revanche, le corécepteur CCR5 peut être une bonne cible, car les individus portant la mutation $\Delta 32$ ne semblent pas atteints de désordres immunologiques majeurs et sont fortement résistants à l'infection par le VIH (Samson, Libert, Doranz, & Rucker, 1996), bien qu'ils pourraient être plus sensible au virus du Nil occidental (Lim, Glass, McDermott, & Murphy, 2006). De plus, dans les patients infectés et traités au Maraviroc, on observe une baisse de la charge virale et une augmentation du nombre de CD4 dans le sang sans présenter d'effets secondaires immunitaires (Gulick et al. 2008). Finalement, le succès thérapeutique du patient de Berlin confirme que le corécepteur CCR5 est une cible privilégiée dans la lutte contre l'infection par le VIH (Hütter et al. 2009). L'objectif des stratégies de thérapies géniques ciblant cette molécule est de reproduire le phénotype des individus $\Delta 32$. De nombreuses approches sont envisageables pour diminuer l'expression de CCR5 à la surface des cellules, en ciblant directement le gène CCR5, l'ARNm ou la protéine :

-Une des approches ciblant directement le gène CCR5 consiste à induire un KO génétique via l'utilisation des nucléases aux doigts de zinc (ZFN). Les ZFN ont les propriétés de pouvoir reconnaître une séquence spécifique d'ADN via les doigts de zinc et d'induire une coupure grâce à l'endonucléase FokI. Le design de deux ZFN, une pour chaque brin d'ADN, va permettre une cassure double brin inactivant le gène ciblé (fig. 14) (Urnov et al., 2005). L'équipe de Paula Cannon a démontré l'efficacité de ZFN ciblant le CCR5 dans un modèle de souris NSG humanisées greffées par des CSHh modifiées. Ces souris présentaient un ratio CD4/CD8 dans le sang stable après infection par le VIH, contrairement aux souris contrôles. De plus, elles sont protégées contre la délétion des CD4 dans différents tissus (rate, moelle osseuse, thymus et intestin). On observe également un avantage sélectif des cellules CCR5 négatives dans le sang et les souris ont des charges virales significativement plus faibles après 6 semaines d'infection (Holt, Wang, Kim, & Friedman, 2010).

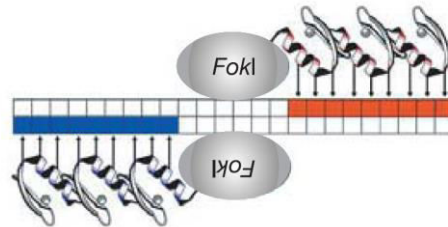


Figure 14: Représentation schématique d'un couple de ZFN. Extrait de Urnov et al. Nature 2005.

-L'expression de la molécule CCR5 peut être également altérée via le système d'ARN interférence (RNAi). Le RNAi est un mécanisme de régulation post-transcriptionnelle d'un gène en ciblant l'ARN messager (ARNm) via des microARN (miRNA), des petits ARN interférents (siRNA) ou encore des ARN en épingle à cheveux (shRNA). L'interaction entre ces ARN et l'ARNm aboutit soit à la dégradation de l'ARNm, soit à un blocage de la traduction inhibant ainsi la production de la protéine ciblée (Deng et al. 2014). Ce système a été utilisé pour cibler l'expression de CCR5 et a permis de démontrer *in vitro* une baisse d'expression du corécepteur à la surface des cellules ainsi qu'une diminution de la réplication virale (Martinez et al. 2003) (Anderson et al. 2009). Dans des souris humanisées BLT, une injection *in vivo* de siRNA CCR5 formulés dans des nanoparticules induit une baisse d'expression du CCR5 à la surface des cellules et préserve le ratio CD4/CD8 dans les animaux infectés. On observe également une diminution de la réplication virale dans les souris traitées car elles présentent des charges virales plus faibles que dans les souris contrôles (Kim et al., 2010).

-La dernière approche développée pour diminuer l'expression de CCR5 consiste à cibler directement la protéine. Trois stratégies peuvent être utilisées, la première repose sur les propriétés intrinsèques des anticorps à reconnaître spécifiquement une protéine. Un transgène codant pour un anticorps dirigé contre la partie N-terminale du CCR5 a été couplé à une séquence de rétention dans le réticulum endoplasmique (RE) appelée KDEL. Cette construction permet de capter et de séquestrer le corécepteur dans le RE et d'induire une baisse d'expression du CCR5 à la surface de lymphocytes T CD4 humains. Des lignées portant cette cassette thérapeutique sont plus résistantes à l'infection par le VIH, ce qui leur confère un avantage sélectif *in vitro* (Swan et al. 2007). La deuxième stratégie, développée par des collaborateurs à mon projet de thèse, est basée sur l'utilisation d'une intrakine et elle va également permettre de séquestrer le CCR5 dans le RE (Hartley et al. 2003). Notre stratégie thérapeutique est basée en partie sur l'utilisation de cette intrakine. La troisième et dernière approche a été récemment développée par une équipe américaine. Ils ont isolé des petites protéines qui affectent l'expression de CCR5 à partir d'une banque générée aléatoirement. Ces protéines appelées trapramers (contraction d'aptamers transmembranaires) ont été générées à partir des séquences transmembranaires des récepteurs couplés aux protéines G, le CCR5 appartenant à cette famille. Bien que le mécanisme ne soit pas complètement élucidé, les cellules exprimant les trapramers présentent une baisse d'expression du CCR5 et sont beaucoup moins sensibles à l'infection par des virus à tropisme R5 (Scheideman et al. 2012).

Cibler le corécepteur CCR5 peut entraîner une pression de sélection sur le virus et favoriser l'émergence de virus à tropisme X4. Des études utilisant des ZFN ciblant le corécepteur CXCR4 ont également démontrées une bonne efficacité contre la réplication virale pour des virus utilisant CXCR4 (Yuan, Wang, Crain, Fearn, & Kim, 2012). Une étude récente combine les deux stratégies en ciblant à la fois CCR5 et CXCR4 via des ZFN dans des lymphocytes T CD4. Dans les souris greffées avec ces cellules modifiées et co-infectées avec un virus R5 et X4, les cellules négatives pour CCR5 et CXCR4 deviennent majoritaires (Didigu, Wilen, & Wang, 2014). Cette stratégie permet de protéger les cellules de la délétion induite par les virus dans le sang et la rate et prévient un changement de tropisme du virus.

Toutes les études précédentes ont démontré l'intérêt de cibler des molécules humaines impliquées dans les étapes initiales de l'infection mais des protéines virales peuvent

également être ciblées. Un petit peptide appelé Enfurvitide (T20), analogue de la gp41 peut se fixer sur cette dernière et bloquer son repliement, inhibant ainsi la fusion entre la cellule et le virus. Cette molécule a fait la preuve de son efficacité en clinique démontrant pour la première fois qu'un inhibiteur de fusion peut influencer sur la charge virale (Kilby et al. 1998). L'équipe du Dr Von Laer a vectorisé ce peptide et y a ajouté une séquence codant pour un domaine transmembranaire, permettant ainsi son expression à la surface d'une cellule. Cette nouvelle construction appelée C46 confère aux cellules transduites une forte résistance à l'infection par le VIH (Egelhofer et al., 2004). Notre stratégie thérapeutique est basée sur ce peptide co-exprimé avec l'intrakine anti-CCR5. Les caractéristiques de ces deux transgènes seront développés plus précisément dans le chapitre « Stratégie d'inhibition d'entrée développée au sein de l'équipe ».

Un autre peptide possédant un pouvoir anti-VIH a été isolé à partir du sang d'un patient. Ce peptide dénommé VIRIP (Virus Inhibitor Peptide) cible la gp41 comme le C46, mais il interagit sur un site différent correspondant aux peptides de fusion, permettant à la gp41 de s'ancrer dans la membrane cellulaire (Münch et al., 2007). Une version optimisée de ce peptide, VIR-576, injecté chez des patients lors d'un essai clinique de phase I/II a permis de baisser la charge virale en quelques jours (Forssmann et al., 2010).

4.2.2.2 La décapsidation, la pré-intégration et la post-intégration

L'évolution a doté les cellules de moyens de défense naturels contre les lentivirus. Il existe des protéines appelées facteurs de restriction qui inhibent des étapes du cycle viral. Dans le cas du VIH, tous les facteurs de restrictions humains sont inhibés par des protéines virales. Cependant, le facteur de restriction TRIM5 α identifié chez le macaque rhésus (rhTRIM5 α), possède des propriétés anti VIH, expliquant la résistance de ces singes face à ce virus (Stremlau et al., 2004b). TRIM5 α est une protéine cytoplasmique qui a la capacité de reconnaître la protéine de la capsid. Les mécanismes d'action de cette protéine ne sont pas totalement élucidés mais il semblerait que la fixation de TRIM5 α sur la capsid forme un complexe forçant la décapsidation, et ce complexe serait ensuite dégradé par le protéasome (Rold et al. 2008). Ce facteur de restriction semble également jouer un rôle important dans l'inhibition des mécanismes de pré-intégration car en absence d'un protéasome fonctionnel, le complexe de pré-intégration (PIC) ne peut pas pénétrer dans le noyau (fig. 15) (Anderson et al. 2006). Cette molécule est donc un excellent gène candidat pour la thérapie génique du VIH.

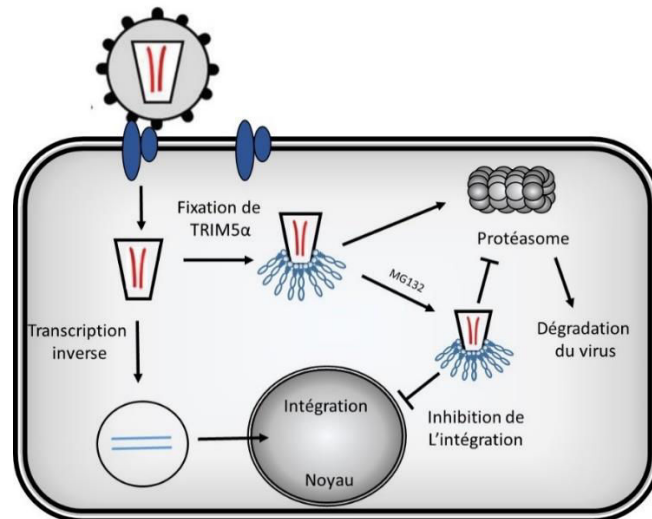


Figure 15 : Schéma représentant la dégradation des lentivirus via le facteur de restriction TRIM5 α . Extrait de Chan et al. Virus 2014.

L'expression de la protéine rhTRIM5 α dans des cellules humaines pourrait induire une réponse immune et entraîner l'élimination des cellules transduites rendant inefficace cette stratégie. La version humaine de TRIM5 α (hTRIM5 α), inefficace contre le VIH, a été modifiée pour aboutir à la formation d'une version chimérique (h-rhTRIM5 α), permettant ainsi une meilleure tolérance contre cette protéine. Cette chimère, légèrement moins efficace que la version simienne confère tout de même aux cellules transduites une protection contre le VIH. En effet, les expériences réalisées *in vitro* montrent que les cellules exprimant ce transgène deviennent majoritaires et que la réplication virale est plus faible que dans les conditions contrôles (Anderson et al. 2008).

Une autre étude de thérapie génique a utilisé ce facteur de restriction associé à deux autres gènes anti VIH, un shRNA ciblant le corécepteur CCR5 et une séquence leurre appelée TAR decoy. Cette dernière mime la séquence virale sur laquelle se fixe la protéine Tat, séquestrant ainsi cette molécule indispensable pour la transcription du provirus. Cette combinaison de transgènes cible donc la fusion (shRNA CCR5), la décapsulation/pré-intégration (TRIM5 α) et la post-intégration (TAR decoy). Cette étude réalisée dans un modèle de souris humanisées par greffe de CSHh montre une protection contre la délétion des lymphocytes T CD4 dans le sang et dans la rate pour deux virus différents (R5 et X4) sans qu'il soit possible de peser la contribution relative de chaque transgène dans ce phénomène. Cette stratégie ne permet en revanche pas d'agir sur la charge virale, contrairement à des expériences réalisées *ex vivo* à partir de cellules transduites triées, qui présentent une

réplication virale plus faible que des cellules non transduites, lorsqu'elles sont infectées par le VIH (Walker et al., 2012).

4.2.2.3 L'intégration

Le LEDGF/p75 est une protéine cellulaire jouant un rôle indispensable pour l'infection par le VIH. Cette protéine ubiquitaire permet l'interaction entre la chromatine cellulaire et l'intégrase du VIH via deux domaines spécifiques, permettant ainsi l'intégration du provirus dans la cellule (cf chapitre I, Intégration et événement post-intégration). Il a été démontré que les cellules déficientes pour cette molécule devenaient résistantes à l'infection (Llano et al., 2006) ce qui en fait une cible potentielle pour la thérapie génique du VIH. Une étude ciblant LEDGF/p75 via différentes stratégies : compétition avec un LEDGF tronqué pour le domaine d'interaction avec la chromatine, ou encore élimination de l'ARNm par des shRNA, a démontré l'intérêt de cibler cette protéine. Les résultats *in vivo* montrent une protection des lymphocytes TCD4 dans le sang et une charge virale plasmatique plus faible (Vets et al. 2012).

4.2.2.4 La transcription du provirus

Les premières stratégies de thérapies géniques du VIH ciblaient principalement les ARN viraux de la protéine Tat (Sun et al. 1995), d'*env/rev* (Yamada, Kraus, Leavitt, Yu, & Wong-Staal, 1994) ou encore la région U5 du virus (Ojwang, Hampel, Looney, Wong-Staal, & Rappaport, 1992). Tous ces ARN sont dégradés par des ARN spéciaux possédant des propriétés catalytiques appelé Ribozymes. D'autres approches utilisent des siRNA ou des shRNA pour cibler les ARN *tat/rev* (Kimpel et al. 2010; Kiem et al. 2010; Anderson et al. 2007; Trobridge et al. 2009), les ARN *vif/pol* (Gu et al. 2012) ou encore les ARN *nef* (Brake et al. 2009). Une dernière stratégie consiste à utiliser de longs ARN antisens pour induire la dégradation des transcrits viraux portant *env* par exemple (Humeau et al., 2004).

Les protéines de régulation Tat et Rev peuvent également être ciblées. La protéine Tat se fixe sur la séquence TAR présente dans les LTR permettant ainsi la transcription des ARN viraux. Rev quant à lui se fixe sur la séquence RRE et permet l'export vers le cytoplasme des ARN viraux pour qu'ils y soient traduits. Ces deux protéines sont indispensables pour le VIH et sont donc par conséquent des cibles thérapeutiques intéressantes. Des séquences leurres TAR et RRE ont été développées pour capter les protéines Tat et Rev et induire une compétition entre les séquences leurres et les séquences virales. Ces leurres diminuent ainsi la

biodisponibilité de ces molécules et influent sur la réplication virale (Li et al. 2003) (Lee et al. 1994). Une autre approche consiste à développer un mutant de la protéine Rev ayant conservé sa capacité à se fixer sur la séquence RRE mais ayant perdu sa fonction biologique. Cette nouvelle protéine appelée mutant transdominant négatif est en compétition avec la protéine Rev sauvage et diminue l'export des ARN vers le cytoplasme (Malim, Böhnlein, Hauber, & Cullen, 1989). Une dernière approche très récente permet d'éliminer le provirus intégré par excision via une recombinase ciblant spécifiquement les LTR (Hauber et al., 2013).

4.2.2.5 Thérapies immuno-géniques

Il existe donc de nombreuses cibles potentielles, cellulaires ou virales, pouvant affecter le virus à différentes étapes de son cycle. D'autres stratégies ont été explorées pour atteindre indirectement le virus via la réponse immunitaire, hors vaccins thérapeutiques, visant cette fois à induire une réponse immunitaire cellulaire ou humorale anti VIH après transfert de gènes.

Pour induire une réponse immunitaire cytotoxique dirigée contre des cellules infectées, une équipe a développé deux molécules chimériques spécifiques de la gp120 ou de la gp41. Ces deux constructions possèdent le domaine cytoplasmique invariant de la chaîne ζ des TCR et le domaine transmembranaire de la molécule CD4. Les domaines extracellulaires de ces TCR sont des régions spécifiques de la gp120 et de la gp41, respectivement une partie de la molécule du CD4 et un anticorps reconnaissant directement la gp41. Des lymphocytes T CD8 ou des cellules NK sont transduits et l'expression de ces peptides à la surface des cellules induit une réponse cytotoxique dirigée contre soit la gp120, soit la gp41 (Roberts et al., 1994) (Tran, Zhang, Byrn, & Roberts, 1995).

Induire une réponse humorale efficace contre le VIH est complexe et reste le principal objectif des stratégies vaccinales. Jusqu'à présent les résultats ne sont pas satisfaisants et c'est pourquoi des stratégies d'immunisations passives ont été développées pour passer outre cette complexité. Quatre Ac neutralisants, tous isolés de patients, ciblent les différentes parties de la gp160 ; le 2F5 et le 4E10 se fixent à la gp41 alors que le 2G12 et le B12 se fixent quant à eux à la gp120 (fig. 16) (Burton et al., 2004). Les injections d'Ac ne permettant pas de maintenir une immunité dans le sérum et les muqueuses pendant une longue période. Les stratégies de transferts de gènes vont permettre d'induire une expression stable et sur du long terme de ces Ac neutralisants. Les expériences de challenge VIH *in vivo*, montrent une

réplication virale fortement atténuées et une protection contre la délétion des lymphocytes TCD4 dans des modèles de souris humanisées exprimant ces Ac (Lewis et al. 2002) (Joseph et al. 2010) (Balazs et al. 2011). Dans l'étude de Balazs, les Ac neutralisants sont vectorisés dans des AAV et injectés en intramusculaire dans la cuisse de souris humanisées. Ce système permet la production d'Ac, de l'ordre de la centaine de $\mu\text{g/ml}$ pendant une année complète. De plus, on observe la même stabilité d'expression des Ac dans les deux modèles de souris immunodéficientes (NSG, BRG) et dans les deux modèles de souris immunocompétentes (C57BL/6, BALB/C). Dans les deux souris immunocompétentes, la thérapie induit une faible production d'Ac dirigés contre les transgènes, sans que cela n'entraîne une diminution de leur production. On observe également une corrélation entre la concentration sérique en Ac et la dose d'AAV utilisée. (A. Balazs, Chen, Hong, & Rao, 2011).

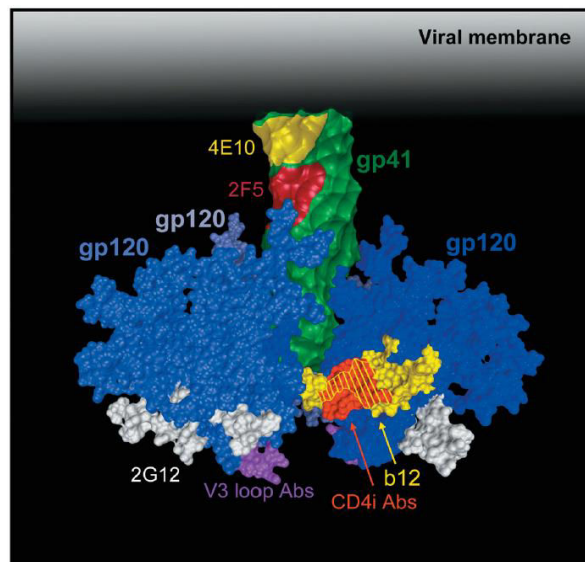


Figure 16 : Représentation des différentes structures ciblées par des anticorps neutralisant ciblant la gp160. Extrait de Burton et al. 2004

4.2.3 Etat des lieux des stratégies de thérapies géniques réalisés in vivo

L'ensemble des stratégies décrites précédemment peuvent être combinées entre elles et testées dans différents modèles de souris humanisées ou chez le singe.

Stratégies	Cibles virales ou cellulaires	Vecteur	Modèle animal	Résultats	Références
shRNA CCR5	CCR5	Lv	NS-PBL (VIH-)	-Baisse d'expression du CCR5	(An et al., 2008)
shRNA CCR5	CCR5	Lv	NSG-PBL (VIH-)	-Transduction <i>in vivo</i> -Baisse d'expression CCR5	(Anderson et al. 2009)
Peptide C46 Anti sens RNA Env shRNA <i>tat/rev</i>	Gp41 Enveloppe Tat/Rev	Lv	NOG-PBL	-Protection des CD4 - Av. Sél. des celules Transduites	(Kimpel, Braun, Qiu, & Wong, 2010)
ShRNA <i>vif/pol</i>	Vif/Pol	Lv	SCID-PBL	-inhibition replication virale (cellules triées avant greffe)	(Gu et al., 2012)
Ac neutralisants	Gp41/gp120	AAV	NSG-PBL	-Protection des CD4 -Ac présents pour 1 an	(Balazs et al. 2011)
TCR	Epitope de Gag	Lv	SCID-PBL	-Diminution du nombre de cellules infectées dans la rate	(Joseph et al., 2008)
ZFN CCR5	CCR5	Ad	NSG-PBL	- Av. sél. des cellules transduites <i>in vitro</i> -Pas de toxicité du vecteur <i>in vivo</i>	(Maier et al., 2013)
ZFN CXCR4	CXCR4	Ad	NSG-PBL	-Av. sél. des CD4 transduits	(Wilén et al., 2011) et (Yuan et al., 2012)
LEDGF/p75	Intégrase	Lv	NSG-PBL	-Protection des CD4 -Effet sur la CV	(Vets et al. 2012)
ZFN CCR5	CCR5	Ad	NOG-PBL	-Avantage sélectif des cellules CCR5 KO -CV plus faible	(Perez et al., 2008)
ZFN CCR5 ZFN CXCR4	CCR5 CXCR4	Ad	NSG-PBL	-Av. Sél des cellules Transduites -Protection des CD4	(Didigu et al., 2014)
Recombinase Tre	LTR	Lv	BRG-Hu BRG-PBL	-Diminution du % d'infection (BRG-Hu) -Diminution de la CV -Prévient la délétion des CD4 (BRG-PBL)	(Hauber et al., 2013)
shRNA CCR5 Leurre Tar	CCR5	Lv	NRG-Hu	-Protection des CD4	(Walker et al., 2012)

Chimérique Humain/ Rhésus TRIM5 α	Tat Intégration			- Av. sél. des cellules Transduites -Pas d'effet sur la CV	
Peptide C46 shRNA <i>tat/rev</i> shRNA CCR5 gène de sélection	gp41 Tat/REV CCR5	Fv	NSG-Hu (VIH-)	-Diminution de la réplication virale <i>in vitro</i> sur des lignées - Pas de toxicité du vecteur pour les CSH -Sélection des CSH transduites <i>in vivo</i> via un gène de sélection	(Kiem et al. 2010)
shRNA <i>nef</i>	Nef	Lv	BRG-Hu	-inhibition de la replication virale <i>ex vivo</i>	(Brake et al. 2009)
Ac neutralisants	Gp41/gp120	Lv	NSG-Hu	-Forte baisse de la CV -Forte baisse du nombre de cellules infectées	(Joseph et al. 2010)
ZFN CCR5	CCR5	Ad	NSG-Hu	-Protection des CD4 -Av. sél. des cellules transduites	(Holt et al., 2010)
Ribozyme CCR5 siRNA <i>tat/rev</i> Leurre Tar	CCR5 Tat/Rev Tat	Lv	SCID- Thymus- Hu	-Inhibition de la réplication virale <i>ex vivo</i> -Phénotype normal des cellules dérivées des CSH transduites	(Anderson et al. 2007)
siRNA <i>rev</i>	Rev	Lv	SCID- BLT	-Inhibition de la réplication virale <i>ex vivo</i>	(Banerjea, Li, Bauer, & Remling, 2003)
Ribozyme CCR5 Leurre Tar	CCR5 Tat	Lv	SCID- BLT	-Inhibition de la réplication virale <i>ex vivo</i>	(Banerjea, Li, Remling, Rossi, & Akkina, 2004)
Intra-corps CCR5	CCR5	Lv	NS-BLT	-Diminution de la réplication virale <i>ex vivo</i>	(Swan et al., 2006)
TCR	Gag	Lv	SCID- BLT	-CD8 dérivés des CSH transduites ont un phéno normal -CD8 ont une activité cytotoxique contre l'Ag	(Kitchen et al., 2009)

TCR	Gag	Lv	NSG-BLT	-Protection des CD4 -Diminution du nombre de cellules infectées -CV ⁺ faible dans les souris transduites	(Kitchen et al., 2012)
shRNA LTR shRNA CCR5	LTR CCR5	Lv	NSG-BLT	-Inhibition de la réplication virale <i>ex vivo</i> -Av. Sél. des cellules transduites	(Ringpis et al. 2012)
shRNA	CCR5	Lv	NSG-BLT	-Inhibition de la réplication virale <i>ex vivo</i> .	(Shimizu et al., 2013)
Endoribonucléase MazF	Clive les motifs ACA des ARN sb	NP	MR-PBL	-Augmentation des T CD4 -Baisse de la CV	(Saito et al., 2013)
Peptide C46 shRNA <i>tat/rev</i> gene de sélection	gp41 Tat/Rev	Lv	MN-CSH	-Av. Sél des TCD4 <i>ex vivo</i>	(Trobridge et al., 2009)
Peptide C46	gp41	Lv	MN-CSH	- Av. Sél des TCD4 dans différents tissus - Protection des CD4 -Baisse de la CV	(Younan et al. 2013)

Tableau 3 : Stratégies *in vivo* de thérapies géniques de l'infection par le VIH. Av. sél : Avantage Sélectif ; FV : Foamy virus ; Ad : Adénovirus ; Lv : Lentivirus ; AAV : Adeno associated virus ; MR : Macaque Rhésus ; MN : Macaque Nemestrina ; NP : non précisé.

4.2.4 Etat des lieux des essais cliniques de thérapies géniques de l'infection par VIH

De nombreuses stratégies décrites précédemment ont été ou sont en cours d'essai clinique chez l'Homme. Il y a actuellement une petite dizaine d'essais cliniques en cours et plus de la moitié ont opté pour un transfert de gènes directement dans des lymphocytes T matures alors que les autres stratégies visent les CSH. Les lymphocytes T présentent l'avantage d'être facilement amplifiables *in vitro* ce qui permet de greffer un nombre élevé de cellules transduites chez le patient (B L Levine et al., 1997). Aujourd'hui, on peut injecter l'équivalent de 10% des lymphocytes T totaux présent dans l'organisme adulte. Le transfert de gènes dans les CSH est basé quant à lui sur le succès thérapeutique du patient de Berlin (Hütter et al. 2009) et sur le postulat que la protection conférée aux lymphocytes dérivés des

cellules CD34 pourrait être de plus longue haleine que celle conférée aux lymphocytes T matures injectées. Compte tenu du faible apport de lymphocytes T thymique à l'âge adulte, ce postulat reste à démontrer. La liste des essais cliniques est détaillée dans le tableau 2 ci-dessous.

Stratégie-	Cible	Vecteur- / cellule	Phase	Références
<u>Essais sur des CSH</u>				
ARN leurre	Virale : protéine Rev	Oncorétrovirus MLV /CSH autologue	Pilote	(Kohn et al., 1999)
Ribosome	Virale : ARNm de <i>tat-vpr</i>	Oncorétrovirus MLV /CSH autologue	I-II	(Mitsuyasu et al. 2009)
ARNsh / ARN leurre / Ribozyme	Virale : ARNm de <i>tat/rev</i> , protéine Tat Cellulaire : ARNm du CCR5	Lentivirus SIN / CSH autologue	Pilote	(DiGiusto et al., 2010)
Mutants Trans-Dominant négatif	Virale : Protéine Rev	Oncorétrovirus MLV /CSH allogénique	I	(Hayakawa et al., 2009) (Kang et al. 2002)
Mutants Trans-Dominant négatif	Virale : Protéine Rev	Oncorétrovirus MLV /CSH autologue		(Podsakoff et al., 2005)
Ribozyme <i>tat/rev</i> mRNA	Virale : ARNm <i>tat/rev</i>	Retrovirus / CSH autologue	II	NCT00002221
<u>Essais sur des LT</u>				
Inhibiteur de la protéine Rev	Virale : Protéine Rev	Plasmide ou retrovirus / Lymphocytes T	Pilote	(Woffendin et al. 1996)
Récepteurs chimériques du VIH	Cellulaire : chaîne ζ	Oncorétrovirus MLV / Lymphocytes T CD4 ⁺ et CD8 ⁺	II	(Deeks et al., 2002)
Ribozyme	Virale : U5 et ARNm <i>pol</i>	Oncorétrovirus MLV / Lymphocytes T CD4 ⁺	I	(Wong-Staal et al. 1998)
Le peptide C46	Virale : la protéine gp41	Oncorétrovirus MLV / Lymphocytes T CD4 ⁺	I	(Lunzen et al. 2007)
Le peptide C46 shRNA CCR5	Virale : la protéine gp41 Cellulaire : CCR5	Lentivirus / Lymphocytes T CD4 et CSH	I-II	NCT01734850
Ribozyme	Virale : ARNm de <i>tat-vpr</i>	Oncorétrovirus MLV / Lymphocytes T CD4 ⁺	Pilote	(Macpherson et al., 2005)

Micro ARN	Virale : ARNm de <i>env</i>	Lentivirus / Lymphocytes T CD4 ⁺	I-II	(McGarrity et al. 2013) (Tebas et al., 2013)
Nucléase aux doigts de Zinc	Cellulaire : gène <i>CCR5</i>	Adenovirus/ Lymphocytes T CD4 ⁺	I-II	(Tebas et al., 2014)
TCR transgénique	Virale : épitopes de Gag	Lentivirus / Lymphocytes T CD8 autologues	I	NCT0091224
ARN Antisens	Virale : Env	Lentivirus/ Lymphocytes T CD4 autologues	I	(Levine et al. 2006)

Tableau 4 : Tableau récapitulatif des essais cliniques de thérapies géniques du VIH jusqu'en 2014.

Les principaux obstacles pour les stratégies de transfert de gènes dans les cellules souches hématopoïétiques sont l'efficacité de la transduction des progéniteurs et une bonne prise de greffe de ces cellules chez le patient. En effet, la fréquence de cellules transduites présentes dans le sang était soit indétectable, soit trop faible pour permettre un bénéfice clinique pour les patients (Kohn et al., 1999) (Kang et al. 2002) (DiGiusto et al., 2010). Cependant, un de ces essais a tout de même permis de montrer un effet, bien que non significatif, sur la charge virale et sur la fréquence des lymphocytes T CD4 (Mitsuyasu et al. 2009). Bien que les résultats cliniques soient modestes, ces essais cliniques sont toutefois assez encourageants car ils ont montré l'absence d'effet indésirable.

Tous les essais cliniques de transfert de gènes dans les lymphocytes T ont démontré la faisabilité et la sécurité de cette approche. Les cellules transduites sont retrouvées plusieurs semaines après la greffe dans tous les essais à l'exception d'un. L'absence de cellules transduites dans cet essai est imputable au vecteur non intégratif utilisé, un plasmide (Woffendin et al. 1996). Une récente étude, suivant les patients de trois essais cliniques sur plusieurs années a montré que les lymphocytes T transduits étaient toujours détectables dans le sang 10 ans après la greffe (Scholler et al., 2012), hormis pour les stratégies utilisant des vecteurs répliatifs (McGarrity et al. 2013). Dans la plupart des autres essais, les cellules transduites ne sont plus détectables au bout d'une année.

En termes de résultats, un essai sort du lot et montre un bénéfice pour les patients. La stratégie employée vise à inhiber l'expression du *CCR5* via des ZFN et les résultats montrent que les cellules transduites déclinent moins vite que les non-transduites, suggérant un

avantage sélectif de ces cellules. De plus, un des patients, hétérozygote pour $\Delta 32$, présente une charge virale plasmatique indétectable et tous les autres patients ont montré une baisse de la quantité d'ADN virale présente dans le sang (Tebas et al., 2014).

Le patient de Berlin et l'essai Sangamo (CCR5-ZFN) confirment chez l'Homme l'intérêt de cibler l'entrée du virus. Dans le chapitre suivant, nous allons détailler le développement de notre stratégie de thérapie génique ciblant l'entrée du virus.

4.2.5 Stratégie d'inhibition d'entrée développée au sein de l'équipe

La stratégie thérapeutique développée pendant ma thèse repose sur l'action combinée de deux transgènes visant à inhiber les étapes initiales de l'infection par le VIH. Le premier transgène, le peptide C46, est un inhibiteur de fusion et le second transgène, l'intrakine P2, altère l'expression du corécepteur CCR5. Les stratégies thérapeutiques combinant plusieurs molécules anti-VIH ont déjà fait preuve de leur efficacité chez l'Homme avec les antirétroviraux. Des approches de thérapies géniques portant plusieurs transgènes ont également montré une efficacité chez la souris humanisée en prévenant la délétion des lymphocytes T CD4 transduits (Walker et al., 2012). Ces stratégies permettent de diminuer le risque de sélectionner des virus mutants échappant à la thérapie.

4.2.5.1 Le peptide C46

Un peptide de 36 acides aminés nommé Enfuvirtide (T20), possède un pouvoir anti-VIH entraînant une forte baisse de la charge virale chez les patients. Le T20 est un analogue de la structure coiled coil C-terminal et va interagir avec son homologue présent en N-terminal. Cette interaction verrouille la gp41 sous une forme linéaire empêchant le repliement indispensable pour la fusion (fig 17 A) (Kilby et al. 1998). L'équipe du Dr Von Laer, a modifié le peptide T20 en y ajoutant 10 acides aminés supplémentaires augmentant ainsi la zone d'interaction avec la gp41. Ce nouveau peptide nommé C46 a ensuite été vectorisé pour être exprimé à la membrane. Un peptide signal (PS) du récepteur de faible affinité du facteur de croissance des nerfs (LNGFR) permet sa translocation dans le réticulum endoplasmique. De plus, la séquence charnière (SC) de l'IgG2 humaine associée à une séquence d'ancrage à

la membrane (SEM) de la molécule CD34 permet son expression à la membrane (fig. 17 B) (Egelhofer et al., 2004).

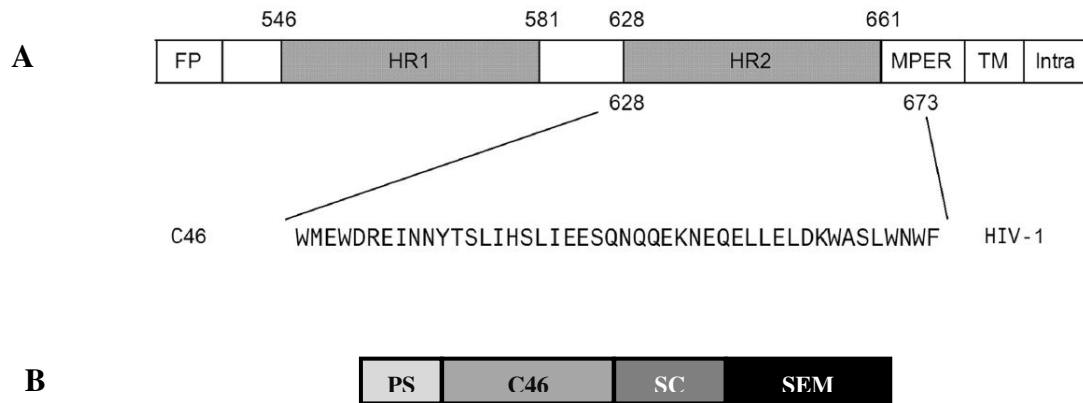


Figure 17 : Représentation schématique de l'interaction du peptide C46 sur la gp41 (A). Représentation schématique du transgène portant le peptide C46 (B). Extrait de Brauer et al. 2013

Cette cassette thérapeutique utilisée dans plusieurs stratégies de thérapies géniques, a montré *in vitro* et *in vivo* une protection des cellules transduites contre le VIH. Une étude de transfert adoptif de lymphocytes T CD4 transduits dans une souris NOG, montre que le transgène confère un avantage sélectif aux cellules après infection. De plus, le virus utilisé a la possibilité d'interagir avec les corécepteurs CCR5 ou CXCR4 pour l'infection confirmant que cette stratégie n'est pas restreinte à un seul tropisme (Kimpel et al., 2010). Dans une autre étude préclinique, les cellules exprimant le transgène possèdent également un avantage sélectif chez des macaques greffés avec des CD34 autologues transduits. De plus, on observe dans ces singes une charge virale plasmatique légèrement plus faible que dans les singes contrôles (Younan et al. 2013). Finalement, un essai clinique de phase I a montré l'absence de toxicité associée à la greffe de lymphocytes T autologues transduits par un oncorétrovirus portant cette cassette thérapeutique. Dans cet essai, la fréquence de lymphocytes T transduits diminue rapidement et il n'y a pas d'impact sur la charge virale, suggérant un silencing actif des régions régulatrices du vecteur. Cependant, il est difficile d'évaluer l'efficacité de cette stratégie dans un essai de phase I car les traitements antirétroviraux des patients influent sur ces paramètres (Lunzen et al. 2007).

4.2.5.2 L'intrakine P2

Il n'est plus nécessaire de démontrer que le corécepteur CCR5 est une cible incontournable dans la lutte contre le VIH. Comme nous l'avons vu précédemment, il existe de nombreuses stratégies de thérapies géniques permettant d'affecter son expression soit en ciblant l'ADN, soit l'ARN ou encore la protéine. Nous avons opté pour cette dernière approche. Il a été montré que les ligands naturels de la molécule CCR5 : Rantes (CCL5), MIP1 α (CCL3) et MIP1 β (CCL4) possèdent des propriétés anti-VIH (Cocchi et al., 1987). Des proches collaborateurs au projet développé durant ma thèse ont exploité cette propriété et ont développé un mutant d'affinité de CCL5 en modifiant la partie N-terminale de la chimiokine sauvage. Ce mutant nommé P2 a montré une affinité pour CCR5 et une inhibition de la réplication virale supérieur à celles de Rantes (Hartley et al. 2003).

Une autre étude, exploitant l'affinité du CCL5 pour son récepteur a développé une nouvelle molécule baptisé intrakine. Cette dernière est la fusion de Rantes avec une séquence KDEL d'adressage à la membrane du réticulum endoplasmique permettant ainsi la séquestration du récepteur CCR5 dans ce compartiment. L'introduction de cette intrakine dans des lymphocytes T humains via un vecteur oncorétroviral a montré une inhibition de la réplication virale pour plusieurs souches de tropisme R5 alors qu'elle n'affecte pas la réplication d'une souche X4 (Schroers, Davis, Wagner, & Chen, 2002).

Basé sur ces études, le mutant P2 à une séquence KDEL formant ainsi l'intrakine P2 (P2i).

4.2.5.3 Combinaison de deux transgènes anti VIH

Notre stratégie thérapeutique est basée sur la co-expression des transgènes C46 et P2i. Nous pensons que des approches ciblant les étapes en amont de la rétrotranscription du virus devraient également diminuer le risque d'apparition de mutants. De plus, notre stratégie devrait nous permettre également de prévenir la mort par pyroptose des cellules suites à des infections abortives. Cette co-expression va permettre l'expression du peptide C46 à la surface de la cellule et en plus diminuer l'expression du corécepteur CCR5, touchant ainsi deux mécanismes clés dans les étapes initiales de l'infection. De plus, une étude a montré que la baisse d'expression du CCR5 à la surface des cellule potentialise l'effet anti VIH du peptide T20 (Heredia et al., 2007). L'un des objectifs de ma thèse a été de montrer l'intérêt de combiner deux inhibiteurs d'entrée pour diminuer l'infection par le VIH.

Comme outil de transfert de gènes, nous avons choisi un vecteur lentiviral SIN (Self-INactivating), avec lequel notre équipe avait une longue expérience (Marodon et al. 2006). Ces vecteurs SIN permettent de diminuer les risques de mobilisation du vecteur par le VIH et permettent également la régulation des transgènes par un promoteur interne diminuant le risque d'activation d'oncogènes via les séquences promotrices des LTR. Toutes ces améliorations de la sécurité sont issues de la délétion dans le LTR3' d'une partie de la région U3 comprenant la TATA box et les sites de fixations des facteurs de transcription Sp1 et NFκB. La rétrotranscription permet de transférer ces délétions dans le LTR5' (Miyoshi et al., 1998). Notre vecteur porte des séquences permettant d'améliorer significativement l'efficacité de la transduction et l'expression des transgènes. Le premier est une petite séquence d'environ 100 nucléotides appelé DNA flap comprenant le central polypurine tract (cPPT) et le central termination sequence (CTS) présent à l'origine dans le gène *pol* du VIH. Cette séquence permet l'import de l'ADN viral dans le noyau de la cellule (Sirven et al., 2000). Le second gène WPRE (Woodchuck hepatitis Post-transcriptional Regulatory Element), issu du virus de l'hépatite de la marmotte d'Amérique, permet d'améliorer la stabilité du transgène et son expression (Ramezani et al. 2000).

L'expression des transgènes est assurée par deux promoteurs ubiquitaires, le promoteur de la phosphoglycérate Kinase (PGK) et le promoteur du facteur d'élongation 1 α (EF1- α). Dans notre étude nous avons utilisé des vecteurs portant le promoteur PGK principalement pour la transduction de la lignée cellulaire NKR-CEMR5. Le promoteur EF1- α permettant une expression plus forte des transgènes a été utilisé lors de transduction de cellules humaines comme des lymphocytes ou des cellules CD34⁺ (Dupuy et al., 2005).

La séquence 2A provenant du virus de la fièvre aphteuse permet la co-expression de deux transgènes sous le contrôle d'un même promoteur à partir d'un même ARNm (Ryan et al. 1991). Cette petite séquence de 19 acides aminés va induire l'hydrolyse de la liaison entre l'ARNt et la glycine C-terminal de la séquence 2A au cœur même du ribosome libérant ainsi la première protéine. Ce mécanisme n'altère pas la traduction de la seconde protéine qui débute sans que le ribosome ne se soit décroché de l'ARNm (Donnelly et al., 2001). L'un des objectifs de ma thèse a été de valider l'utilisation de vecteurs lentiviraux exprimant deux inhibiteurs d'entrée pour leur pouvoir à diminuer l'infection par le VIH.

4.2.5.4 Modèle murin

Le choix du modèle animal pour cette étude s'est porté sur le transfert adoptif de lymphocytes T humains transduits. Nous avons vu en effet que la majorité des essais cliniques de thérapies géniques anti-VIH utilise ce protocole. De plus, il est en train de montrer son efficacité *in vivo* (essai sangamo) ce qui n'est pas le cas de la stratégie via le transfert de gènes dans les CSH, beaucoup plus délicat à mettre en place chez les patients, mais aussi chez les souris. L'avantage majeur de ce modèle est qu'il est rapide à mettre en œuvre et permet de générer rapidement des résultats *in vivo*. Un des points forts de ce modèle est que l'infection par le VIH entraîne une forte délétion des lymphocytes T CD4 et un de nos objectifs est de démontrer l'efficacité de nos transgènes contre cette délétion. En revanche, son principal inconvénient est l'induction d'une xéno-GVHD en une quarantaine de jours post-greffe. Les meilleures conditions de greffe pour pouvoir étudier l'efficacité de la thérapie génique doivent donc être soigneusement établies. Ce modèle est un puissant outil pour démontrer l'avantage sélectif conféré aux cellules transduites, car il est facile de déterminer la proportion de cellules protégées dans le sang des animaux. En revanche, l'état d'hyper-activation des cellules lié à la xéno-GVHD est favorable au virus ce qui fait que ce modèle n'est peut-être pas idéal pour juger de l'effet de la stratégie sur les charges virales.

4.2.5.5 Objectifs de la thèse

Mon projet de thèse comportait 3 objectifs principaux :

- Mettre en place au laboratoire un modèle de souris humanisées susceptibles à l'infection par le VIH et en tirer des enseignements qualitatifs et quantitatifs sur la délétion des lymphocytes T CD4, la dynamique de la réplication virale et l'évolution de la diversité virale. Cette partie du projet fait l'objet des résultats exposés dans l'article 1 (soumis pour publication).

- Valider *in vitro* l'utilisation de vecteurs lentiviraux exprimant deux inhibiteurs d'entrée pour une stratégie de thérapie génique. Cette partie du travail est exposée dans les résultats de l'article 2 (accepté pour publication dans *Human Gene Therapy*).

- Enfin, valider *in vivo* l'avantage sélectif, la protection contre la délétion et l'effet sur la charge virale de la stratégie dans un modèle de souris humanisées proche de la réalité clinique des essais de thérapie génique anti-VIH chez l'homme. Cette partie du travail fait l'objet des résultats présentés dans l'article 3 (en cours de finalisation).

Rationnel

On assiste depuis quelques années à un regain d'intérêt pour la thérapie génique anti-VIH. Alors que les différents essais vaccinaux contre le VIH s'avèrent décevants, les succès de la thérapie génique eux s'affirment, dans le champ du VIH mais aussi dans d'autres pathologies (Cartier et al., 2012), (Cavazzana-Calvo et al., 2010). D'autre part, l'émergence de résistances aux traitements classiques, ainsi que les effets secondaires, motivent la recherche de stratégies qui pourraient permettre d'arrêter la thérapie médicamenteuse. La découverte de la mutation $\Delta 32$ dans le gène CCR5 a initié un intérêt considérable pour de nouvelles thérapies visant CCR5. La description du premier cas avéré de guérison de l'infection par le VIH suite à la greffe de précurseurs hématopoïétiques déficients en CCR5, le patient de Berlin (Allers et al., 2011), réaffirme l'intérêt de cibler CCR5 dans toutes stratégies de thérapies géniques (H. Kiem, Jerome, Deeks, & Mccune, 2012). Chez l'homme l'essai Sangamo, reposant sur le transfert de lymphocytes T autologues modifiés pour ne plus exprimer CCR5, montre que la délétion des cellules modifiées est plus faible que celles des cellules non transduites. De plus, les auteurs observent une baisse de la charge virale au moins chez un patient, déjà hétérozygote pour la mutation $\Delta 32$ (Tebas et al., 2014).

Un nombre croissant d'études est publié dans le domaine de la thérapie génique anti-VIH chez la souris humanisée. Citons les travaux les plus significatifs du groupe de P. Cannon, parus en 2010 (Holt et al., 2010), qui montrent une prévention très efficace de la délétion des lymphocytes T CD4, grâce à des nucléases à doigts de zinc, rendant les progéniteurs déficients en CCR5. De plus, les auteurs documentent un avantage sélectif massif conféré aux cellules n'exprimant pas CCR5, celles-ci passant de moins de 5% à plus de 80% des cellules du sang en 2 semaines après infection. Une autre publication montre aussi un avantage sélectif des cellules exprimant une combinaison de transgènes thérapeutiques touchant CCR5 et des protéines essentielles au cycle viral dans les souris humanisées (Walker et al., 2012). Le peptide C46 a également démontré son efficacité dans plusieurs publications scientifiques. Une étude basée sur le transfert de cellules T matures exprimant ce transgène montre un avantage sélectif transitoire pour les cellules transduites, bien qu'il n'y ait aucun impact sur la charge virale dans les souris infectées (Kimpel et al., 2010). Une autre étude, quant à elle réalisée chez le singe, confirme l'intérêt d'utiliser le peptide C46 comme gène anti-VIH, car elle montre qu'une greffe de CSH transduites permet de générer des lymphocytes T CD4 exprimant le transgène chez l'animal. Les auteurs observent un avantage

sélectif de ces cellules dans les singes après un challenge par du SHIV ainsi qu'une charge virale plus faible dans les animaux traités.

Les stratégies ciblant l'entrée du virus semblent prometteuses, c'est pourquoi nous avons également opté pour une stratégie d'inhibition d'entrée combinant un anti-CCR5 (intraquine P2) et un inhibiteur de fusion (peptide C46). L'ensemble de nos résultats feront l'objet de trois publications. La première démontre l'efficacité de notre stratégie *in vitro* dans une lignée et des cellules humaines. La seconde décrit le modèle des souris humanisées infectées par le VIH. En l'absence de réponse immune contre le virus, la dynamique de la réplication virale ressemble à la phase primaire de l'infection chez l'homme, ce qui valide le modèle pour des études de thérapies géniques. La troisième démontre l'efficacité de la stratégie dans un modèle de souris humanisées suite au transfert de PBMC.

Résultats

Article 1: The dynamic of HIV replication is partly independent of the immune response in humanized NOD.SCID. α γ c-/- mice (article non soumis).

Les modèles de souris humanisées sont devenus très performants ces dernières années et ils sont, contrairement au modèle simien, susceptibles à l'infection par le VIH. On peut citer les souris humanisées BLT générées par greffe de CSH associées à des tissus humains de foie et de thymus fœtaux. De plus, l'efficacité de la reconstitution hématopoïétique dans ces modèles leur permet d'être infectés par les voies muqueuses et ils sont également capables de générer une réponse immunitaire cellulaire et humorale. Les autres modèles de souris humanisées, générées par transfert de CSH humaines seules (souris-Hu), ne présentent pas les mêmes qualités en termes de reconstitution et de réponses immunitaires. Le modèle NSG-Hu utilisé, nous a permis d'évaluer la dynamique virale dans un environnement sans pression de sélection. Dans un premier temps, nous avons confirmé qu'entre nos mains, ces souris ne généraient pas de réponse immunitaire contre le VIH ni cellulaire ni humorale. De plus dans ce modèle, pendant la phase aiguë en 30 jours on observe une déléition des lymphocytes T CD4⁺ qui est corrélée avec l'augmentation de la charge virale. Sur du plus long terme, au sacrifice des animaux, on observe également la déléition des lymphocytes T CD4⁺ CCR5⁺ dans la rate et dans la moelle osseuse, mais de façon surprenante cette déléition n'est pas retrouvée dans le sang. Tardivement, certaines souris présentent un rebond de la charge virale et un retour des lymphocytes T CD4 et il n'y a plus de corrélation entre la charge virale et le nombre de lymphocytes T CD4. L'étude de la diversité virale de la boucle V3 de la gp120 montre qu'il n'y a pas d'un changement de tropisme de R5 vers X4, dans notre modèle de souris humanisées.

The dynamic of HIV replication is partly independent of the immune response in humanized NOD.SCID. γ c⁻ /- mice

Nicolas Petit ^{1,2,3}, Sidonie Lambert ^{4,5,6}, Sylvie Garcia ⁷, Anne-Geneviève Marcelin ^{4,5,6}
and Gilles Marodon ^{1,2,3}

1 Sorbonne Universités, UPMC Univ PARIS 06, CR7, Centre Immunologie et Maladies Infectieuses (CIMI), F-75013, Paris, France

2 INSERM, U1135 (CIMI), F-75013, Paris, France

3 CNRS, ERL 8255 (CIMI), F-75013, Paris, France

4 Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, UMR_S 1136, Institut Pierre Louis d'Epidémiologie et de Santé Publique, F-75013, Paris, France

5 INSERM, UMR_S 1136, Institut Pierre Louis d'Epidémiologie et de Santé Publique, F-75013, Paris, France

6 AP-HP, Hôpital Pitié-Salpêtrière, Service de Virologie, Paris, F-75013, France

7 Institut Pasteur, F-75015, Paris, France

Short title: HIV replication and evolution without selective pressure

Corresponding author: Dr G Marodon, CIMI, INSERM U1135, CNRS ERL 8255, CERVI, 83 Bd de l'Hopital, F-75013 PARIS, France, e-mail: gilles.marodon@upmc.fr, tel: +33 14 217 7468

Keywords: HIV, humanized mice, replication, diversity, CCR5

Abstract

To which extent the immune response controls HIV replication and exerts selective pressure on the virus is still an unsettled question. NOD.SCID. γ c^{-/-} mice (NSG) transplanted with CD34⁺ cord blood progenitors at birth represent a unique *in vivo* model for HIV infection of human CD4⁺ T cells. However, the immune response to HIV is severely hampered in those mice. This provides a unique opportunity to determine the influence of intrinsic vs. extrinsic factors on the replication and evolution of the virus in the absence of selective pressure. Here, we show that depletion of CD8⁺ T cells prior to infection failed to impact on the peak viral load and that HIV-specific antibodies were lacking in the late phase of the infection, confirming that the immune response to HIV is, if present, very poor in NSG humanized mice. After infection, viral loads reached a peak that spontaneously resolved thereafter in most of the mice, similar to the acute phase of the infection in humans. Likewise, the extent of CD4⁺ T cell deletion in the blood was correlated with viral loads during the first 30 days after infection. Importantly, CD4⁺ T cell deletion was not associated with a preferential loss of CD4⁺CCR5⁺ cells in the blood but in the periphery. After a short 'latent' phase, CD4⁺ T cells and the virus reappeared at high levels in some mice. Sequencing of the V3 loop of the envelope gene of HIV showed that this spontaneous 'rebound' was not due to a switch from R5 to X4-tropic viruses. Thus, our results show that resolution of the viral peak may occur in the absence of a functional immune response, supporting the notion that viral replication in the acute phase may be limited by the number of targets in the periphery rather by the immune response.

Introduction

Due to the strong limitations of SIV-infected monkeys as models of HIV infection for routine use, a renewed interest in humanized mice (HuMice) bearing human T cells susceptible to HIV infection is witnessed (1). In earlier models, total human PBMCs or purified CD4⁺ T cells from infected patients were grafted in immunocompromised SCID or NOD/SCID mice. However, due to inefficient engraftment and other limitations, these models have not been extensively used. The best murine model of HIV infection so far has been developed by V. Garcia and colleagues in which NOD/SCID mice are grafted with human fetal thymus and liver tissues while receiving CD34⁺-isolated fetal liver progenitors (2). In these Bone marrow-Liver-Thymus (BLT) chimeras, human T cell reconstitution is so efficient that infection of HIV through mucosal route can readily be obtained (3). Furthermore, the full spectrum of the cellular and humoral response to the virus was reported in this model (4). The drawback of this efficient reconstitution is the development of graft-vs-host-disease (GVHD) that may ultimately kill a subsequent fraction of these mice (5). Furthermore, the establishment of the BLT model is complicated by the limited availability outside of the United States of the fetal-derived biological materials needed to set up the model.

Reconstitution of NOD/SCID. γ c^{-/-} (NSG or NOG, depending on the nature of the γ c mutation) or RAG-2. γ c^{-/-} mice on the BALB/c background (BRG) with cord blood progenitors has allowed important progress in the design and validation of new therapeutic strategies, such as gene therapy (6). However, a poor anti-HIV immune response has been reported in these models. For instance, Baezinger et al. reported detectable human antibodies to HIV in only 1 out of 25 BRG HuMice (7), whereas Watanabe et al. reported the same in 3 out of 14 NOG HuMice (8). Aside the BLT model, evidence for a cellular response to HIV are also scarce in HuMice. A weak CD8-mediated response was observed against HIV peptides in infected NSG HuMice (9). We also reported a weak cellular response to HCV antigens in NSG HuMice (10). Thus, the promise of the model as a platform to validate candidate vaccines has still to be fulfilled.

Several mathematical models of HIV infection have proposed that early viral dynamics is dictated both by intrinsic dynamic of viral-target interactions and by the magnitude of the initial immune response (11). Up to now, it has been difficult to

weigh the relative contributions of both on HIV replication *in vivo*. Most of our understandings on HIV replication and the immune system comes from the analysis of viral sequences in relation to CD8-T cell epitopes and their evolution as the disease progress (12). In SIV infection, depletion of CD8+ T cells after administration of chimeric mAb has revealed a key role for these cells in the control of the viral loads (13). Although this appears quite established, the mechanism is still unclear since depletion of CD8+ T cells did not change the decay rate of productively infected cells, suggesting that they do not control viral replication by cytolysis of infected cells (14, 15). Thus there is still major gaps in our understanding on the role for CD8 T cells on the control of viral replication. However, virological and immunological events during the early phase of the infection are major determinants of the outcome of the infection (16). This is further illustrated by the recent findings showing that viral reservoirs for SIV are established even before the viral peak (17). Thus, a better comprehension of the early dynamic of HIV *in vivo* may lead to better prophylaxis and design of better vaccines.

We exploit the immunocompromised status of NSG HuMice to study the dynamic of viral replication and the evolution of the V3 loop of the *env* gene in the absence of any selective pressure on the virus. HIV-infected HuMice is indeed a quite unique setting *in vivo* where the virus is free to replicate, only limited by the availability of target cells, by its own replicative capacity and by its intrinsic adaptation to the host. Moreover, the comparison of multiple animals reconstituted with cells of the same donor, hence with the same genetic make-up, informs on the stochastic and deterministic contribution to the observed parameter. This approach has been used by the team to reveal the deterministic nature of the human T cell repertoire (18). Our results show that immunocompromised NSG HuMice recapitulate some important features of the primary phase of the infection in humans without an immune response. This observation support the notion that the immune response to the virus is not the sole force regulating viral replication.

Results

Lack of cellular and humoral immune responses in HIV-infected NSG HuMice

We first wanted to confirm that the anti-HIV immune response was inoperative in our model, as previously suggested in similar models of HuMice. We first evaluated the role of the CD8-mediated immune response during the initial phase of HIV infection. Relative to its original description (19), we used the improved chimeric anti-simian CD8 MT807R1 to deplete human CD8⁺ T cells prior to infection in CD34-reconstituted HuMice. To rule out masking by the MT807R1 Ig of subsequent CD8 staining, we used a clone that still detected the CD8 molecule after short incubation with MT807R1 (figure supplemental 1). Depletion of CD8⁺ T cells with this reagent was long-lasting since CD8⁺ T cells were still missing 50 days after injection (fig. 1A). Oddly, a tendency towards lower viral loads was observed in CD8-depleted animals (fig. 1B), although the high p value and the low number of animals analyzed preclude any definitive conclusions to be made. Thus, we did not observe the higher peak in viral loads that was expected if CD8⁺ T cells would have controlled viral replication in this early phase. To investigate the anti-HIV immune response in HuMice at later time points after infection, we measured the presence of anti-HIV specific antibodies in the sera of 3 HIV-infected mice 112 and 214 days after infection. No signs of anti-HIV specific antibodies were detected in the sera of these mice by western blot (fig. 1C). Altogether, our results show that NSG HuMice infected with HIV lacked detectable cellular and humoral immune responses.

CD4⁺ T cell deletion in HIV-infected NSG HuMice correlates with viral loads in the acute phase of the infection

We next wanted to determine if CD4 deletion, a hallmark of early phase of HIV infection in humans was also observed in NSG HuMice. Prior to infection, mice were stratified so that the frequencies of human CD45⁺CD3⁺CD4⁺ T cells in the infected vs. the non-infected group were similar (fig. 2A). We measured the extent of CD4 deletion in the blood of these mice after i.v infection with the CCR5-tropic HIV Bal. We observed a progressive reduction in the frequencies of CD4⁺ T cells in the HIV-

infected group in the first 30 days after infection relative to controls (fig. 2A). Overall, there was a 2-fold reduction in the frequencies of CD4⁺ T cells in the blood of infected animals relative to controls (fig. 2B). Furthermore, reduced frequencies (fig 2C) and absolute numbers (fig 2D) of CD4⁺ T cells in the blood correlated well with increased viral loads. Thus, elimination of CD4 cells from the blood in the initial phase of the infection is coherent with the hypothesis of a direct viral cytopathic effect in infected cells.

CD4⁺CCR5⁺ T cell deletion in the spleen but not in the blood of HIV-infected NSG HuMice

To go into deeper details in the characterization of this deletion, we assessed the frequencies of CD4⁺CCR5⁺ T cells, a major target for HIV in humans, in the blood before and after infection and in the periphery at the end of the experiment. Surprisingly, except for one mice which has a very high frequency of CCR5⁺ cells in CD4⁺ T cells to start with, there was no sign of deletion in the blood when frequencies of CD4⁺CCR5⁺ cells were compared pre and post-infection (fig. 3A-B). In contrast, deletion of CD4⁺CCR5⁺ T cells was readily observed during the same period in the spleen and in the bone marrow if animals infected or not with HIV were compared (fig. 3C-D). Thus, CD4⁺CCR5⁺ deletion is only evident in peripheral lymphoid organs in the primary phase of the infection.

Lack of correlation between viral loads and CD4 deletion revealed by long term follow-up of HIV infection in NSG HuMice

To gain a better appreciation on the dynamics of HIV infection in the long-term in HuMice, we performed regular measurements of the viral loads and CD4⁺ T cell frequencies in the blood for 240 days after infection in experiment I and 168 days in experiment II (fig. 4). Overall, the mice were sampled 13 times in experiment I and 7 times in experiment II using maxillary vein punctions. In both experiments, the viremia peaked rapidly (before 30 days after infection) with means of 70,000 and 20,000 viral copies per ml of blood in experiment I and II, respectively (fig. 4A-B) (this difference in the peak value might be due to the lower amount of HIV used for infection in the second experiment). After this initial peak, viral loads spontaneously

decreased to reach a set-point, most often in the undetectable range of the assay, which due to the small volume of sera sampled was above 2,000 copies/ml. Major differences among mice in the two experiments could be observed. For instance, mouse 160 in experiment 1 had viral loads at the peak ten times higher than other mice, which ranged from 10,000 to 50,000 viral copies/ml. As already demonstrated in figure 1, the viral loads correlated well with the extent of CD4 deletion in this early phase, although the variability in the extent of CD4 deletion was higher in experiment II (fig 4C-D).

Our extensive set of data reveals another interesting feature of HIV dynamics in the HuMice model. After their initial drop, frequencies of CD4⁺ cells returned to pre infection levels in most of the mice (fig. 4C-D). Only one mouse out of the 10 analyzed presented a complete loss of CD4 T cells very late after infection (mouse 245 in experiment II, figure 4D). This «rebound» in CD4⁺ T cells, occurring from D90 onwards in experiment I (fig. 4C), was observed despite a viral «rebound» around the same time period, clearly documented a discrepancy between viral loads and CD4 deletion at a later phase of the infection. Only two mice experienced a similar viral rebound at very high levels in the later phase of the infection in experiment II (fig. 4B). The dissociation between viral replication and CD4 loss was most apparent in mouse 355 in experiment I that presented 40% of CD4⁺ T cells in human CD45⁺CD3⁺ cells of the blood despite viral loads greater than one million viral copies/ml. Overall, there was no significant correlation between frequencies of CD4⁺ T cells in the blood and viral loads in the analysis was performed on samples collected after 100 days of infection (fig. 4E) and this was also true if absolute numbers of CD4⁺ T cells from the spleen were correlated to VL at the end of the experiments (fig. 4F). In fact, there was a trend for an inverse correlation but the low number of available samples makes it impossible to discriminate from chance.

Thus, our results show that two phases of the infection can be isolated in HuMice: an early phase in which increased viral loads are correlated to increased CD4 deletion (fig. 2) and a later phase in which there is no more correlation due to the high variability in the outcome of viral replication and CD4 deletion (fig. 4).

No switch to X4-variant during the course of HIV infection in HuMice

To gain further insights into viral evolution without an immune response, we analyzed the viral diversity of the V3 loop of gp120 in HIV-infected HuMice. We obtained sequences of PCR-amplified products, either as a bulk (direct amplification of the viral RNA from the serum) or from sub-cloned PCR products. A total of 254 sequences from 6 mice (mean number of sequence / mouse \pm SD = 42.3 ± 13) at 2 different time points after infection (D54 (n=4) and D150 (n=2)) were analyzed. Geno2pheno analysis of the bulk sequence with a 10% FDR reveals no significant switch to X4-variants in any of the mouse, showing that the viral rebound described above was not due to the emergence of X4-variants. Individual analysis of the 254 sequences reveals that the V3 loop was very conserved among samples (Fig. 5). Two mice had no variations in the V3 loop compared to the consensus and only two to three mutations per mouse were found in the four remaining mice. Very few sequences differed from the consensus and only two differed at the same position in two independent mice (F20L/I and E25A/G). Of note, one mutation (E25A) that was significantly associated with X4-tropism in a previous study (20), was found in one mouse but this sequence was not classified as an X4-tropic by Geno2pheno. Thus, there was very few, if any, evidence for a switch to a X4-tropic virus in the absence of a selective pressure in our HIV-infected HuMice.

Discussion

Our study represents the most detailed set of data determining the early and late dynamic of HIV replication and evolution in the unique setting of NSG HuMice. The contribution of viral replication in relation with the number of target cells was evaluated in the absence of any detectable immune response. In previous studies using similar models of HuMice infected with an R5-tropic virus, viremia rapidly increased to reach a plateau rather than returning to a viral set-point, as we observed here. Only few studies showed a bell-shaped curved for the viremia during the primary phase in HuMice, distancing the model from the physiological reality (reviewed in Berges and Rowan (21). A similar pattern of viral replication than ours was obtained by Gorantla et al. in the same NSG HuMice model infected with low dose of the R5-tropic ADA virus (9). This may suggest that the NSG HuMice infected with CCR5-tropic HIV are particularly prone to recapitulate the human pattern of viral replication. Of note is that the route of infection does not seem to play a major role here since we used intravenous injection for infection whereas Gorantla et al. used the intra-peritoneal route. It is curious to note however that the BLT model, the most advanced model of HIV infection in HuMice, also failed to recapitulate the pattern of the primary phase of the infection (4). The nature, the route, the dose of the virus, the strain of immunodeficient mice and the genetic make-up of the CD34⁺ cell donor may all contribute to explain why HuMice do not always recapitulate the primary phase of the infection in humans.

We provide the first results documenting the effect of depleting CD8⁺ T cells prior HIV infection in HuMice, thereby completely preventing the possibility for an immune response to develop. In that setting, we noticed no significant rise in viral loads at the peak, showing that CD8 T cells did not negatively control the magnitude of the peak. We also conclude from this observation that the resolution of the peak, starting before 30 days post-infection in 6/10 mice, is probably independent of the anti-HIV CTL response, since it took place in the absence of CD8⁺ T cells which were undetected for more than 50 days after injection of the chimeric mAb. This result suggests that the intrinsic viral-target model (in which viremia is primary controlled by the number of target cells relative to the number of infectious virions) is sufficient to explain the observed profiles (22). Our data therefore strongly support *in vivo* the notion derived from *in silico* mathematical modeling suggesting that viral

adaptation (fitness) to the host is a major determinant during the early phase of the infection (11). This does not necessarily exclude a role for CD8 T cells in controlling HIV infection. A favorable MHC allele might be crucial to tip the balance towards effective control (23). As put forward in the introduction of this manuscript, the mechanisms by which the cellular immune response control HIV replication are still a mystery. Cytolysis of SIV-infected cells appears not to play a major role (24). Moreover, a study in rhesus monkeys infected with SIV showed that depletion of CD8⁺ T cells increased CD4 T cell activation and enhanced viral replication but also showed that these two events were dissociated (25). HuMice infected with HIV are uniquely amenable to study the role for CD8⁺ T cells in controlling HIV replication. To our knowledge, our present report and the one from Gorantla et al (9) represent the only examples towards this goal. The report from Gorantla et al. shows that depletion at 2 weeks after infection resulted in increased viral loads in 4 mice two weeks later but representation of the data precludes analysis of the inter-individual variability, which seems rather high (figure 5 in (9)). However, they noticed very little effect of the depletion on viral loads in established HIV infection at 5 weeks post infection (9). Given the high variability in the outcome of the infection that we describe here, more studies are needed to definitely conclude that CD8 T cells control HIV replication in HuMice.

In another attempt to detect anti-HIV responses in HuMice, we failed to detect HIV-specific antibodies at later time points after infection, even though viremia had come back in some of the analyzed mice. This would indicate that the humoral response is also defective in the model. This is a disputed question since some reports detected humoral responses in HIV-infected HuMice whereas others did not (reviewed in Berges and Rowan (1). In other studies, the numbers of animals in which this response was detected is low (see Introduction). The limited number of mice analyzed in our study precludes any definitive conclusions to be drawn but our results support the notion that the humoral IgG response to HIV is rather limited in HuMice. The humoral response does not seem to be involved in the control of viral replication late in infection in HuMice since mice 355 experiencing rebound was negative for anti-HIV antibodies. More experiments are needed to better apprehend the mechanisms that control viral replication late in infection in HuMice.

A thought-provoking observation was the fact that CD4⁺CCR5⁺ T cell deletion was not observed in the blood in the acute phase of the infection despite deletion of

CD4⁺ T cell and reduction in viral loads. To the contrary, CD4⁺CCR5⁺ cells were clearly reduced in peripheral organs at this stage, confirming, with other results in HuMice (26), that CD4⁺CCR5⁺ cells of the periphery are indeed a major target for destruction by HIV in humans. Indeed, two papers reported ten years ago that CD4⁺CCR5⁺ T cells were not deleted from the blood in the primary phase of the infection in humans. Deletion preferentially affected CD4⁺CCR5⁺ cells of the gastrointestinal (GI) tract (27, 28). Unfortunately, NSG HuMice are deficient for human cell reconstitution in the GI tract (29), precluding mucosal infection in HuMice (our unpublished observation and (30). How can the discordant data between blood and peripheral organs in terms of deletion of CCR5⁺ cells be interpreted? One possibility would be that CD4 deletion from the blood in the earliest phase of the disease reflects trapping of these cells away from the blood, a phenomenon that would be independent of CCR5 since frequencies of those cells remained untouched in the blood. It has been shown that CD4⁺CCR6⁺ T cells are depleted from the blood in HIV infected individuals and trapped in the spleen where they die by apoptosis (31). A thorough assessment of chemokine receptor expression in the blood and the periphery of HuMice may bring useful informations on the mechanisms of CD4 deletion during the acute phase of HIV infection. Very few studies have examined the implication of cell migration in relation to HIV-mediated deletion. It has been shown in HuMice that migration of infected cells to the lymphoid organs is necessary for efficient spreading of HIV and was associated with syncytia formation (32), showing that HuMice may reveal unknown aspects of the infection in humans.

If CD8 T cells did not control the resolution of the peak in our study, then what did? Our favorite possibility, supported by a simple mathematical model of the early phase of the infection (33) (valid if the influence of the immune system is ruled out), would be that viral load decreased as a consequence of exhaustion of viral targets. However, as described above, there is no sign for a specific deletion of CD4⁺CCR5⁺ T cells in the blood. Thus, in our hypothesis, the virus detected in the blood may rather come from CD4⁺CCR5⁺ T cells trapped in the periphery, for instance the spleen in HuMice, and perhaps the GI tract in humans, sites where early deletion of CD4⁺CCR5⁺ T cells is reported in humans and in BLT HuMice. Of note is that a viral rebound was observed in a mouse lacking CD4 T cells in the blood (#245), suggesting that virus detected in the blood came from CD4 T cells residing in peripheral organs. Which exact type of cells produce HIV in HuMice is still unknown

and it is possible that human monocytes/macrophages may have contributed as well. A genetic study tracing HIV diversity in various organs and cells in HuMice would be much useful to better apprehend the source of HIV in HuMice. Besides, these data would further strengthen the relevance of the model to the human physiology since compartmentalization of HIV to various cells and tissues has been reported (34).

Due to viral and CD4 rebounds, we noticed a lack of correlation between CD4 frequencies and VL at late time points after infection, in contradiction with the negative correlation observed during the primary phase of the infection. The rebound in CD4 T cells may reflect a release of trapped CD4 T cells in the recirculation, observed in multiple mice in our study, by others in HuMice (35) and in humans as well. We cannot exclude that these new CD4 T cells came from the thymus, although our preliminary data indicate that HIV may infect the thymus in HuMice (NP, unpublished).

In general, the baseline activation level of CD4 T cells is high in NSG HuMice (10). We also noticed high expression levels of CCR5 in HuMice that tended to increase as the mouse aged (NP, unpublished). Furthermore, it has been shown that CD4 T cells are activated by HIV infection in BLT HuMice, as judged by their lower expression of CD45RA and CCR7 and higher expression of Ki67 (4). Thus, HuMice provide the ideal activation context for HIV to replicate. The lack of correlation in the late phase of the infection might thus be explained if CD4⁺ T cells in old HuMice would proliferate faster than their destruction by HIV. This hypothesis remains to be tested with pharmacological interventions to modulate viral replication, cell cycle or apoptosis, but is supported by our observation that CD4 T cell expansion goes awry in some HuMice, particularly males (NP, unpublished and (10). An alternative possibility to explain viral rebounds would be that the lack of immune response in HuMice would prevent the immune system to clear HIV-infected cells, hence the uncontrolled HIV replication in some mice.

To our knowledge, our results represent the first set of data examining V3 loop diversity in HIV-infected NSG HuMice. A previous report on that topic concerned BRG HuMice infected with a different HIV molecular clone (JRCSF) (36). A major discrepancy between the two studies is the description of functional X4-variants in one mouse that we could not confirm here. We did not find sequences susceptible to confer a switch to X4-using virus in our mice, despite the similar number of mice and sequences analyzed in the two studies. The lack of evidence for a highly cytopathic

X4-variant in our genetic analysis is functionally validated by the lack of CD4 deletion in mice where high viral loads were observed. Mutations elsewhere on the genome that would have rendered HIV non-cytopathic is a possibility that remains to be investigated. Immune selective pressure on the virus is likely to be the same in the two studies since both failed to detect anti-HIV antibodies. The use of the IL-2 immunotoxin Ontak may have favored the emergence of X4-using variants in the BLT study. The mechanism behind this remains unclear. Clearly, there is still no definite explanation to the discrepancy but the combined results between the two studies show that only one X4-variant was observed out of 468 sequences analyzed, suggesting that apparition of X4-variants are rare in the absence of selective pressure. It has been reported that HIV rapidly evolves to adapt to the CTL immune response in BLT HuMice but the switch to X4-using variants has not been reported (37). Future studies in advanced models of HuMice may indicate which selective pressure (CTL, antibodies or therapy) leads to the emergence of X4-variants.

Overall, our results document striking similarities between the primary phase of the infection in humans and HuMice without selective pressure from the immune system. This observation highlights the interest of using HuMice for designing and validating novel therapeutic strategies that target the initial phases of the infection. Furthermore, they document the possibility that the impact of the immune system on HIV dynamic during the primary phase might have been largely overestimated.

Material and methods

Generation of humanized mice and HIV infection

NOD.Cg-Prkdcscid-II2rgtm1Wjl/SzJ (NSG) mice (stock #00557) were bred in animal facilities Centre d'Expérimentation Fonctionnelle (CEF) according to the Jackson Laboratory handling practice for this strain of immunodeficient mice. 24hrs-48hrs old newborn NSG mice are irradiated at 1 Gy and grafted with $5 \cdot 10^4$ to $2 \cdot 10^5$ human cord blood-purified CD34+ cells by the intra-hepatic route. Human hematopoietic progenitor cells were obtained from cord blood sample collected from healthy donors after informed consent. CD34+ cells were sorted with human CD34 MicroBeads kit (Miltenyi), according to the manufacturer's instructions. HIV infection was performed i.v in the retro-orbital sinus in a final volume of PBS1x-diluted HIV of 100 μ l. Mice were infected with viral stocks of HIV Bal, Yu2 or NL4D8, all strains known to use CCR5 as a co-receptor, with doses indicated on each figure legend. Viral stocks were titered by p24 ELISA according to the manufacturer's instructions (Zeptomatrix, Buffalo, NY). The local ethical committee approved all mice experimental protocols.

Viral production, quantification and sequence

Plasma HIV-1 RNA viral loads were measured using the COBASw AmpliPrep/COBASw TaqMan HIV-1 Test, version 2.0 (Roche Diagnostics, Branchburg, NJ, USA), with a lower quantification limit of 20 copies/mL. Due to the small volumes of serum from the mice, a dilution was necessary to reach the volume needed for the assay. Thus, this detection limit raised up to 100-fold using mouse serum. HIV-1 coreceptor usage was determined from the V3 env region sequence by Geno2Pheno (<http://coreceptor.bioinf.mpi-sb.mpg.de>) algorithm for B and non-B subtypes as described (38). Details on the PCR protocol leading to V3 sequences is available on request (<http://www.hivfrenchresistance.org>). Western blot analysis was performed according to the manufacturer's instructions (New Lav Blot I, Bio-rad, Hercules, CA). Viral stocks were produced by calcium phosphate transfection on 293T cells with 10 μ g of plasmids encoding HIV Bal, Yu2 or NL4D8 (AIDS Reference and Reagent Program, Washington, USA).

CD8 depletion in HuMice

The MT807R1 recombinant Ig was provided by the Nonhuman Primate Reagent Resource (NIH contract HHSN272200900037C and grant RR016001). MT807R1 is a recombinant Ig consisting of rhesus IgG1k constant regions and CDRs derived from the anti-human CD8 antibody M-T807 grafted into rhesus variable framework regions. The antibody was expressed in vitro using serum free medium and purified by protein A affinity chromatography. Endotoxin was <1EU/mg. The MT807R1 Ig was injected i.p at a concentration of 10mg/kg into 17 to 36 weeks-old NSG HuMice at 10mg/kg. Control mice received the same volume of PBS.

Flow cytometry

Cell suspensions were stained with optimal quantity of antibodies at a concentration of 10^7 cells/ml in a final volume of 100 μ l of PBS/SVF 3%. Incubation was performed in the dark at 6°C for 20 min. The following monoclonal antibodies were used for cell surface staining: anti-CCR5 conjugated with APC (2D7; BD Pharmingen), anti-CD4 PerCP (RPA-T4, Biolegend), anti-CD8 A700 or Pacific Blue (HIT8a, RPA-T8, Biolegend), anti-CD8 PE (DK25, DAKO), CD45 APC (HI30, Biolegend), CD3 PeCy7 (UCHT1, Biolegend), CD45 PE-CF594 (HI30, BD Pharmingen). All cell preparations were acquired on LSRII cytometer (BD) and analyzed with FlowJo software (Tree Star, Portland, OR).

Statistical analysis

All statistical analyses were performed with an alpha of 95% with the Prism software v6 for Mac (GraphPad, USA).

Acknowledgements

The authors wish to thank L. Mercey for her help in the initial phase of this project, Dr K. Reimann for the CD8-depleting antibody, K. Dorgham for his help in PCR cloning, Dr G. Churlaud for sharing data on HuMice. This work was funded by grants to GM and to AGM from the ANRS (Agence Nationale de la Recherche contre le SIDA). NP was supported by doctoral fellowships from the SIDAAction/Fondation Pierre Bergé and from the ANRS.

Disclosure: the authors declare no conflict of interest

Figure legends

Figure 1. Lack of a cellular and humoral immune responses in HIV-infected NSG HuMice. (A) 17 to 36 weeks-old CD34-reconstituted NSG mice were injected with PBS (+PBS) or 10mg/kg of a chimeric anti-CD8 depleting antibody (+MT807R1) and infected i.v with 1 to 15 ng p24 of HIV Bal or NL4D8 3 days later. Shown is a representative profile of a CD8/CD4 staining in CD45+CD3+ cells from the blood 50 days after injection. (B) Viremia was measured at the indicated time points by the Cobas qPCR. Control mice received PBS whereas CD8-depleted mice received 10mg/kg of MT807R1 Ig i.p. (C) Western-blot detection of p24-specific antibodies. Blood of the indicated mice from experiment I (see legend figure 3) were drawn at the indicated days after infection with 15 ng p24 HIV Bal. Arrows indicate the localization of the expected antibodies to the indicated specificity. Hu Ig= positive control

Figure 2. CD4+ T cell deletion in HIV-infected NSG HuMice. (A) Representative CD4/CD8 profiles from non-infected (HIV-) and infected (HIV+) NSG HuMice at the indicated time after infection with 15ng of HIV Bal at 19 weeks of age. (B) Cumulative results showing frequencies of CD4+ T cells in CD45+CD3+ human cells in the blood as a function of days relative to the day of infection (D0 on the graph). (C) Correlation between viral loads (VL) and frequency of CD4+T cells in human CD45+CD3+ cells at 30 days post infection with 10 to 50 ng p24 of HIV Bal, NL4D8 or Yu2. Results shown are cumulative from 4 independent experiments with HuMice aged from 19 to 28 weeks of age when infected. Each dot represents a single mouse. (D) Correlation between viral loads (VL) and absolute numbers of CD4+ in the spleen of HuMice infected with 50 ng p24 of Yu2 at 25 weeks of age. Results represent values obtained at 14 and 37 days post infection from a total of 5 mice analyzed in a single experiment. The non-parametric Spearman correlation coefficient and the p value are indicated in panels C and D.

Figure 3. CD4+CCR5+ T cell deletion in HIV-infected NSG HuMice. (A) Representative staining for CD4 and CCR5 expression in the blood by flow cytometry 5 days before (upper panels) and 23 days after (lower panels) infection of 20 weeks-old NSG HuMice with 50 ng of p24 of Yu2 virus. Numbers on the profiles indicate percentages of positive cells according to the gate set in the FMO condition (FMO=

fluorescence minus one). (B) Cumulative frequencies of CCR5+ cells in CD45+CD3+CD4+ T cells measured in the blood before and after infection. (C) Representative staining for CD4 and CCR5 expression in CD45+CD3+ from the spleen of non-infected (upper panels) and HIV-infected (lower panels) NSG mice (D) Cumulative frequencies of CCR5+ cells in human CD45+CD3+ cells from the spleen and the bone marrow (BM) 37 days after infection with 50 ng p24 of Yu2 of 25 weeks-old NSG HuMice. Control mice (HIV-) are non-infected NSG HuMice from two independent experiments euthanized at 13 and 17 weeks of age. A Student two-tailed unpaired t-test was performed to compare the means (**p<0.005;***p<0.001).

Figure 4. Lack of correlation between viral loads and CD4 deletion revealed by long term follow-up of HIV infection in NSG HuMice. (A) Experiment I; viral loads (VL) in 5 NSG HuMice infected with 15 ng p24 of HIV Bal at 19 weeks of age. (B) Experiment II; viral loads (VL) in 5 NSG HuMice infected with 25 ng p24 of HIV Bal at 22 weeks of age. (C) Frequencies of CD4+ cells in CD45+CD3+ human cells in the blood of NSG HuMice from experiment I. (D) Frequencies of CD4+ cells in the blood of NSG HuMice from experiment II. Each line represent an individual mouse indicated in the legends by a number. (E) Correlation between viral loads (VL) and frequencies of CD4+ cells in human CD45+CD3+ cells in the blood of mice from experiment I and II. Results shown are values obtained from day 100 after infection to the end of the experiment. (F) Correlation between viral loads (VL) and absolute numbers of CD4+ cells in human CD45+CD3+ T cells 5 to 13 weeks after infection in the spleen of NSG HuMice infected with 10 to 50 ng of p24 of Yu2 at 25 or 28 weeks of age. The non-parametric Spearman correlation coefficient and the p value are indicated on panels E and F.

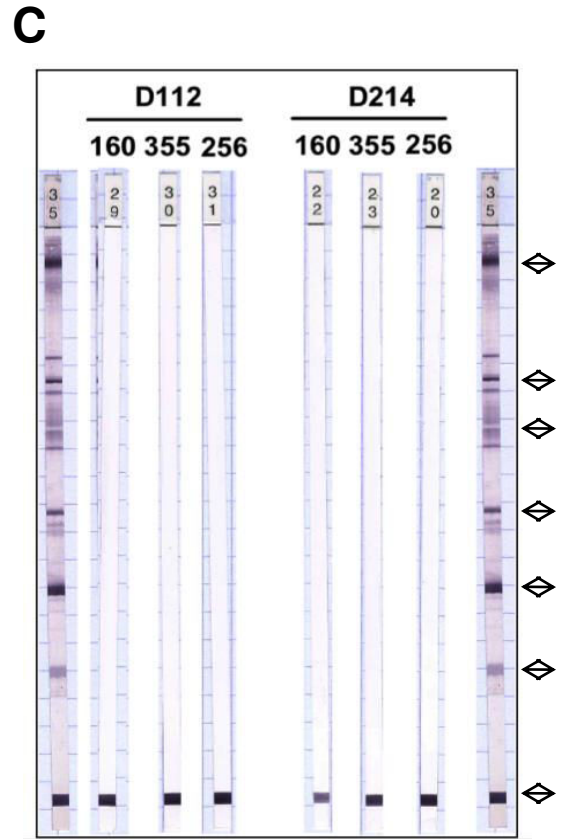
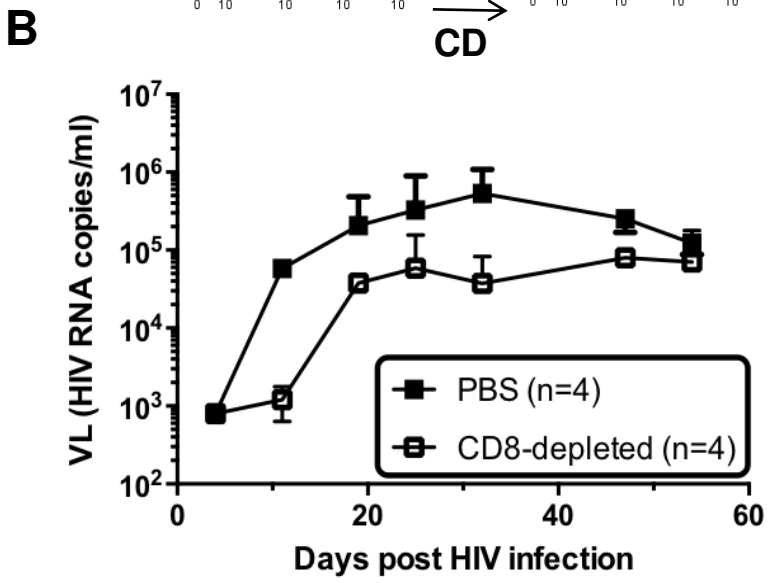
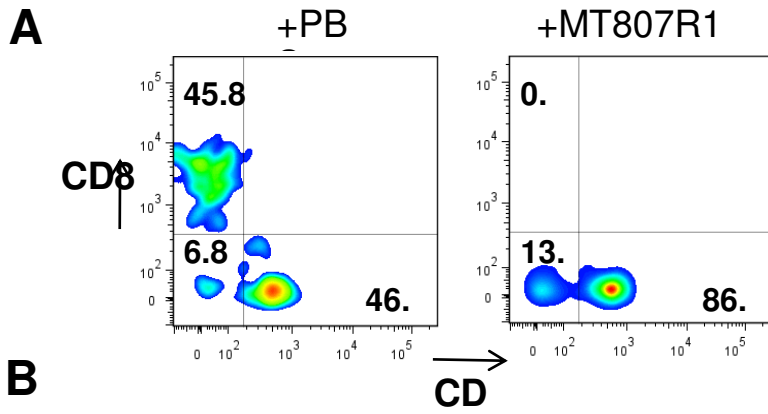
Figure 5. No switch to X4-variant during the course of HIV infection in HuMice. Numbers of mutated sequences as a function of their position on the consensus V3 loop of gp120 sequence. The mutated amino-acid is indicated above the bars. The color code indicates the mice in which the sequence was found. Mixed colors in the bars denote that mutation at this location was detected in two different mice of the indicated color.

References

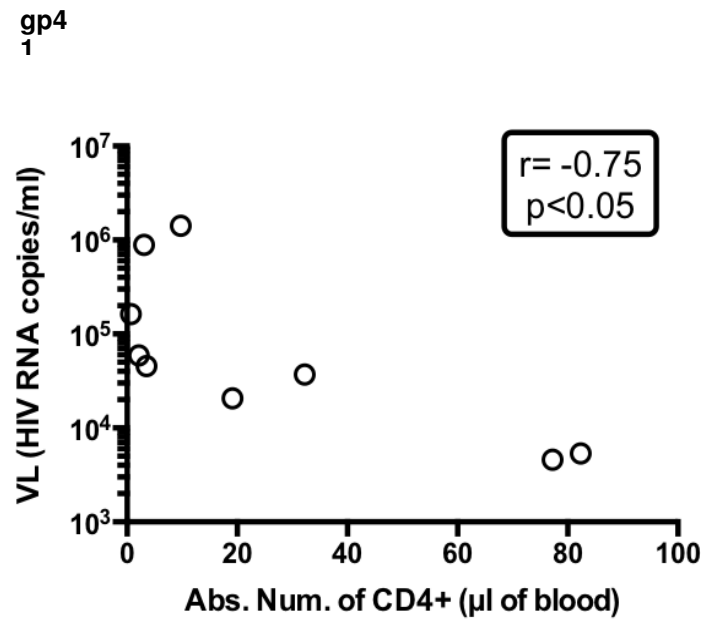
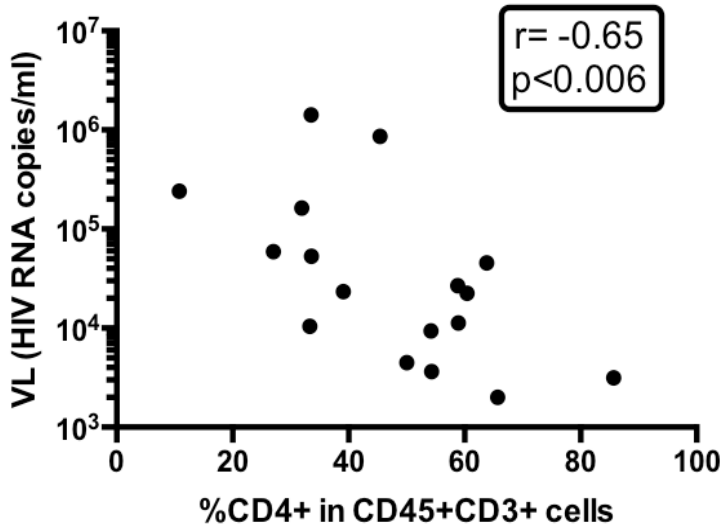
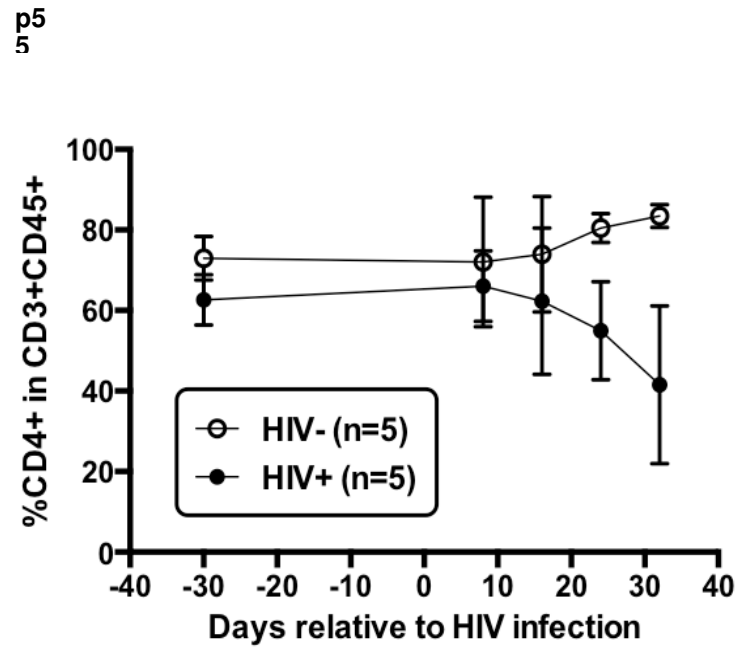
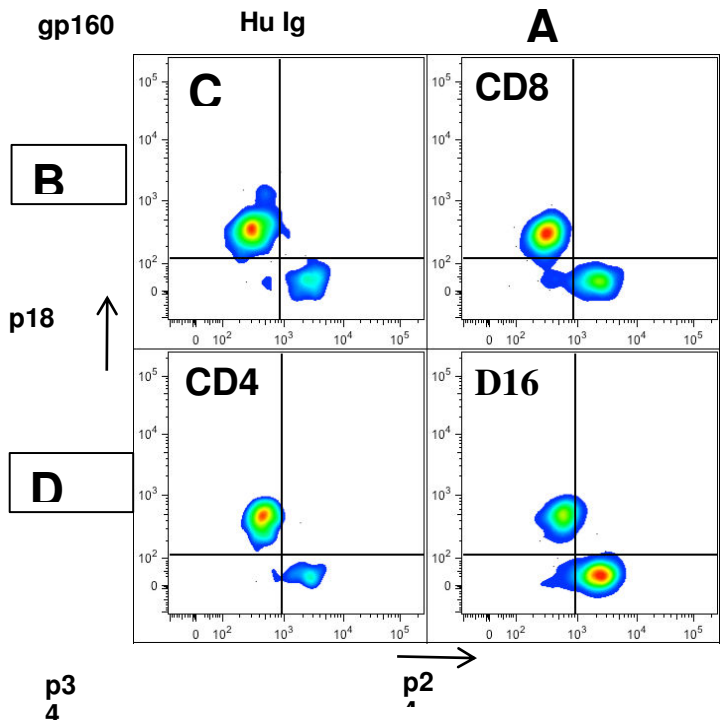
1. Berges, B. K., and M. R. Rowan. 2011. The utility of the new generation of humanized mice to study HIV-1 infection: transmission, prevention, pathogenesis, and treatment. *Retrovirology* 8: 65.
2. Denton, P. W., and J. V. Garcia. 2012. Mucosal HIV-1 transmission and prevention strategies in BLT humanized mice. *Trends Microbiol.* 20: 268–274.
3. Sun, Z., P. W. Denton, J. D. Estes, F. A. Othieno, B. L. Wei, A. K. Wege, M. W. Melkus, A. Padgett-Thomas, M. Zupancic, A. T. Haase, and J. V. Garcia. 2007. Intrarectal transmission, systemic infection, and CD4+ T cell depletion in humanized mice infected with HIV-1. *J Exp Med* 204: 705–714.
4. Brainard, D. M., E. Seung, N. Frahm, A. Cariappa, C. C. Bailey, W. K. Hart, H.-S. Shin, S. F. Brooks, H. L. Knight, Q. Eichbaum, Y.-G. Yang, M. Sykes, B. D. Walker, G. J. Freeman, S. Pillai, S. V Westmoreland, C. Brander, A. D. Luster, and A. M. Tager. 2009. Induction of Robust Cellular and Humoral Virus-Specific Adaptive Immune Responses in Human Immunodeficiency Virus-Infected Humanized BLT Mice. *J. Virol.* 83: 7305–7321.
5. Greenblatt, M. B., V. Vrbancic, V. Vrbancic, T. Tivey, K. Tsang, A. M. Tager, and A. O. Aliprantis. 2012. Graft versus host disease in the bone marrow, liver and thymus humanized mouse model. *PLoS One* 7: e44664.
6. Bennett, M. S., and R. Akkina. 2013. Gene therapy strategies for HIV/AIDS: preclinical modeling in humanized mice. *Viruses* 5: 3119–41.
7. Baenziger, S., R. Tussiwand, E. Schlaepfer, L. Mazzucchelli, M. Heikenwalder, M. O. Kurrer, S. Behnke, J. Frey, A. Oxenius, H. Joller, A. Aguzzi, M. G. Manz, and R. F. Speck. 2006. Disseminated and sustained HIV infection in CD34+ cord blood cell-transplanted Rag2-/- γ c-/- mice. *PNAS* 103: 15951–15956.
8. Ishikawa, F., M. Yasukawa, B. Lyons, S. Yoshida, T. Miyamoto, G. Yoshimoto, T. Watanabe, K. Akashi, L. D. Shultz, and M. Harada. 2005. Development of functional human blood and immune systems in NOD/SCID/IL2 receptor γ chain(null) mice. *Blood* 106: 1565 – 73.
9. Gorantla, S., E. Makarov, J. Finke-Dwyer, C. L. Gebhart, W. Domm, S. Dewhurst, H. E. Gendelman, and L. Y. Poluektova. 2010. CD8+ cell depletion accelerates HIV-1 immunopathology in humanized mice. *J. Immunol.* 184: 7082–7091.
10. Marodon, G., D. Desjardins, L. Mercey, C. Baillou, P. Parent, M. Manuel, C. Caux, B. Bellier, N. Pasqual, and D. Klatzmann. 2009. High diversity of the immune repertoire in humanized NOD.SCID.g γ c-/- mice. *Eur J Immunol* 39: 2136–2145.
11. Perelson, A. S., and R. M. Ribeiro. 2013. Modeling the within-host dynamics of HIV infection. *BMC Biol.* 11: 96.
12. McMichael, A. J., P. Borrow, G. D. Tomaras, N. Goonetilleke, and B. F. Haynes. 2010. The immune response during acute HIV-1 infection: clues for vaccine development. *Nat. Rev. Immunol.* 10: 11–23.
13. Schmitz, J. E., M. J. Kuroda, S. Santra, V. G. Sasseville, M. A. Simon, M. A. Lifton, P. Racz, K. Tenner-Racz, M. Dalesandro, B. J. Scallon, J. Ghayeb, M. A. Forman, D. C. Montefiori, E. P. Rieber, N. L. Letvin, and K. A. Reimann. 1999. Control of viremia in simian immunodeficiency virus infection by CD8+ lymphocytes. *Science (80-.)*. 283: 857–860.
14. Klatt, N. R., E. Shudo, A. M. Ortiz, J. C. Engram, M. Paiardini, B. Lawson, M. D. Miller, J. Else, I. Pandrea, J. D. Estes, C. Apetrei, J. E. Schmitz, R. M. Ribeiro, A. S. Perelson, and G. Silvestri. 2010. CD8+ lymphocytes control viral replication in SIVmac239-infected rhesus macaques without decreasing the lifespan of productively infected cells. *PLoS Pathog.* 6: e1000747.

15. Wong, J. K., M. C. Strain, R. Porrata, E. Reay, S. Sankaran-Walters, C. C. Ignacio, T. Russell, S. K. Pillai, D. J. Looney, and S. Dandekar. 2010. In vivo CD8⁺ T-cell suppression of siv viremia is not mediated by CTL clearance of productively infected cells. *PLoS Pathog.* 6: e1000748.
16. Centlivre, M., M. Sala, S. Wain-Hobson, and B. Berkhout. 2007. In HIV-1 pathogenesis the die is cast during primary infection. *Aids* 21: 1–11.
17. Whitney, J. B., A. L. Hill, S. Sanisetty, P. Penaloza-MacMaster, J. Liu, M. Shetty, L. Parenteau, C. Cabral, J. Shields, S. Blackmore, J. Y. Smith, A. L. Brinkman, L. E. Peter, S. I. Mathew, K. M. Smith, E. N. Borducchi, D. I. S. Rosenbloom, M. G. Lewis, J. Hattersley, B. Li, J. Hesselgesser, R. Geleziunas, M. L. Robb, J. H. Kim, N. L. Michael, and D. H. Barouch. 2014. Rapid seeding of the viral reservoir prior to SIV viraemia in rhesus monkeys. *Nature* 512: 74–77.
18. Pham, H.-P., M. Manuel, N. Petit, D. Klatzmann, S. Cohen-Kaminsky, A. Six, and G. Marodon. 2012. Half of the T-cell repertoire combinatorial diversity is genetically determined in humans and humanized mice. *Eur J Immunol* 42: 760–770.
19. Schmitz, J. E., M. A. Simon, M. J. Kuroda, M. A. Lifton, M. W. Ollert, C. W. Vogel, P. Racz, K. Tenner-Racz, B. J. Scallon, M. Dalesandro, J. Ghayeb, E. P. Rieber, V. G. Sasseville, and K. A. Reimann. 1999. A nonhuman primate model for the selective elimination of CD8⁺ lymphocytes using a mouse-human chimeric monoclonal antibody. *Am J Pathol* 154: 1923–1932.
20. Milich, L., B. H. Margolin, and R. Swanstrom. 1997. Patterns of amino acid variability in NSI-like and SI-like V3 sequences and a linked change in the CD4-binding domain of the HIV-1 Env protein. *Virology* 239: 108–118.
21. Berges, B. K., and M. R. Rowan. 2011. The utility of the new generation of humanized mice to study HIV-1 infection: transmission, prevention, pathogenesis, and treatment. *Retrovirology* 8: 65.
22. Perelson, A. S., A. U. Neumann, M. Markowitz, J. M. Leonard, and D. D. Ho. 1996. HIV-1 dynamics in vivo: virion clearance rate, infected cell life-span, and viral generation time. *Science* (80-.). 271: 1582–1586.
23. Goulder, P. J. R., and D. I. Watkins. 2008. Impact of MHC class I diversity on immune control of immunodeficiency virus replication. *Nat. Rev. Immunol.* 8: 619–630.
24. Davenport, M. P., and J. Petravic. 2010. CD8⁺ T cell control of HIV--a known unknown. *PLoS Pathog.* 6: e1000728.
25. Okoye, A., H. Park, M. Rohankhedkar, L. Coyne-Johnson, R. Lum, J. M. Walker, S. L. Planer, A. W. Legasse, A. W. Sylwester, M. Piatak, J. D. Lifson, D. L. Sodora, F. Villinger, M. K. Axthelm, J. E. Schmitz, and L. J. Picker. 2009. Profound CD4⁺/CCR5⁺ T cell expansion is induced by CD8⁺ lymphocyte depletion but does not account for accelerated SIV pathogenesis. *J. Exp. Med.* 206: 1575–1588.
26. Nie, C., K. Sato, N. Misawa, H. Kitayama, H. Fujino, H. Hiramatsu, T. Heike, T. Nakahata, Y. Tanaka, M. Ito, and Y. Koyanagi. 2009. Selective infection of CD4⁺ effector memory T lymphocytes leads to preferential depletion of memory T lymphocytes in R5 HIV-1-infected humanized NOD/SCID/IL-2R γ manull mice. *Virology* 394: 64–72.
27. Brenchley, J. M., T. W. Schacker, L. E. Ruff, D. a Price, J. H. Taylor, G. J. Beilman, P. L. Nguyen, A. Khoruts, M. Larson, A. T. Haase, and D. C. Douek. 2004. CD4⁺ T cell depletion during all stages of HIV disease occurs predominantly in the gastrointestinal tract. *J. Exp. Med.* 200: 749–59.
28. Mehandru, S., M. A. Poles, K. Tenner-Racz, A. Horowitz, A. Hurley, C. Hogan, D. Boden, P. Racz, and M. Markowitz. 2004. Primary HIV-1 infection is associated with

- preferential depletion of CD4⁺ T lymphocytes from effector sites in the gastrointestinal tract. *J. Exp. Med.* 200: 761–70.
29. Denton, P. W., T. Nochi, A. Lim, J. F. Krisko, F. Martinez-Torres, S. K. Choudhary, A. Wahl, R. Olesen, W. Zou, J. P. Di Santo, D. M. Margolis, and J. V. Garcia. 2012. IL-2 receptor [gamma]-chain molecule is critical for intestinal T-cell reconstitution in humanized mice. *Mucosal Immunol.*
30. Hofer, U., S. Baenziger, M. Heikenwalder, E. Schlaepfer, N. Gehre, S. Regenass, T. Brunner, and R. F. Speck. 2008. RAG2^{-/-} gamma(c)^{-/-} mice transplanted with CD34⁺ cells from human cord blood show low levels of intestinal engraftment and are resistant to rectal transmission of human immunodeficiency virus. *J Virol* 82: 12145 – 53.
31. Lecureuil, C., B. Combadiere, E. Mazoyer, O. Bonduelle, A. Samri, B. Autran, P. Debre, and C. Combadiere. 2007. Trapping and apoptosis of novel subsets of memory T lymphocytes expressing CCR6 in the spleen of HIV-infected patients. *Blood* 109: 3649–3657.
32. Murooka, T. T., M. Deruaz, F. Marangoni, V. D. Vrbanac, E. Seung, U. H. von Andrian, A. M. Tager, A. D. Luster, and T. R. Mempel. 2012. HIV-infected T cells are migratory vehicles for viral dissemination. *Nature* 490: 283–7.
33. Phillips, A. N. 1996. Reduction of HIV concentration during acute infection: independence from a specific immune response. *Science (80-.)*. 271: 497–499.
34. T. Blackard, J. 2012. HIV Compartmentalization: A Review on a Clinically Important Phenomenon. *Curr. HIV Res.* 10: 133–142.
35. Berges, B. K., W. H. Wheat, B. E. Palmer, E. Connick, and R. Akkina. 2006. HIV-1 infection and CD4 T cell depletion in the humanized Rag2^{-/-}-gamma c^{-/-} (RAG-hu) mouse model. *Retrovirology* 3: 76.
36. Ince, W. L., L. Zhang, Q. Jiang, K. Arrildt, L. Su, and R. Swanstrom. 2010. Evolution of the HIV-1 env gene in the Rag2^{-/-} gammaC^{-/-} humanized mouse model. *J. Virol.* 84: 2740–52.
37. Dudek, T. E., D. C. No, E. Seung, V. D. Vrbanac, L. Fadda, P. Bhoumik, C. L. Boutwell, K. A. Power, A. D. Gladden, L. Battis, E. F. Mellors, T. R. Tivey, X. Gao, M. Altfeld, A. D. Luster, A. M. Tager, and T. M. Allen. 2012. Rapid Evolution of HIV-1 to Functional CD8⁺ T Cell Responses in Humanized BLT Mice. *Sci. Transl. Med.* 4: 143ra98.
38. Lengauer, T., O. Sander, S. Sierra, A. Thielen, and R. Kaiser. 2007. Bioinformatics prediction of HIV coreceptor usage. *Nat. Biotechnol.* 25: 1407–10.

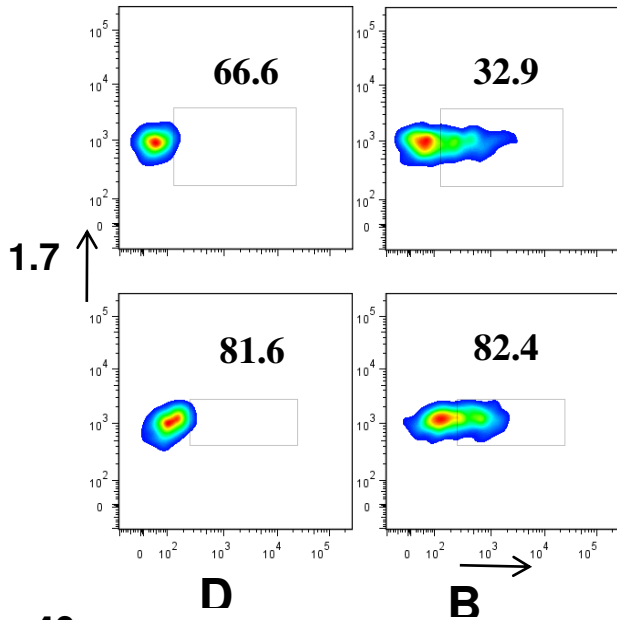


Figure

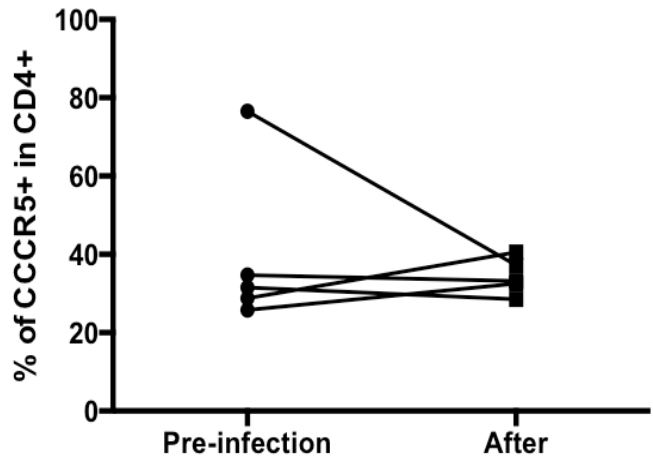


D32 p.i

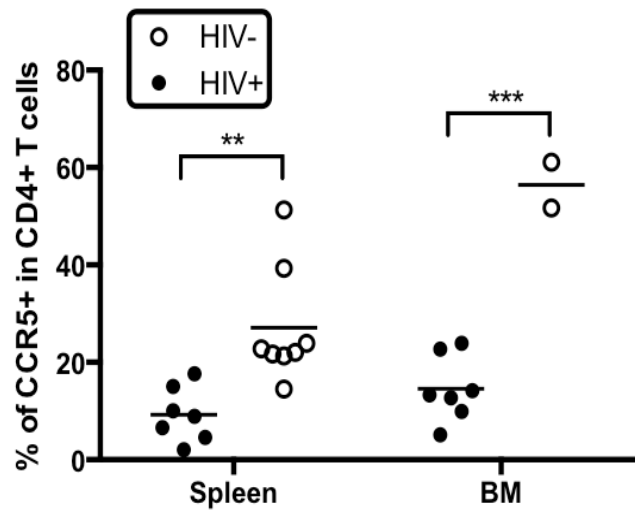
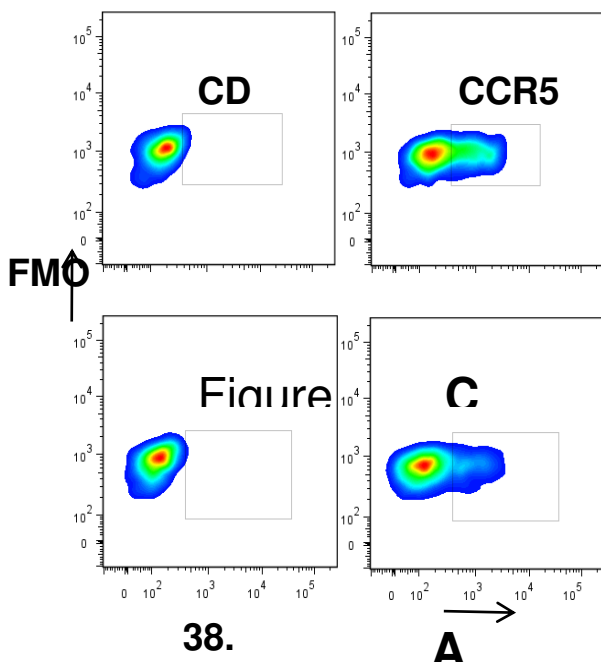
Figure



HIV

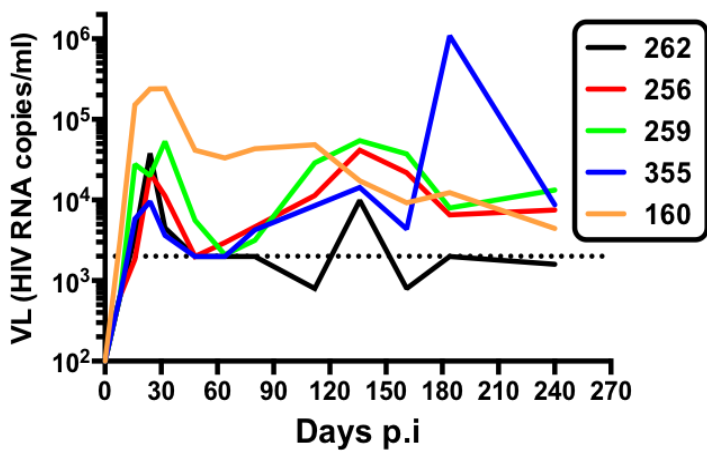


HIV-

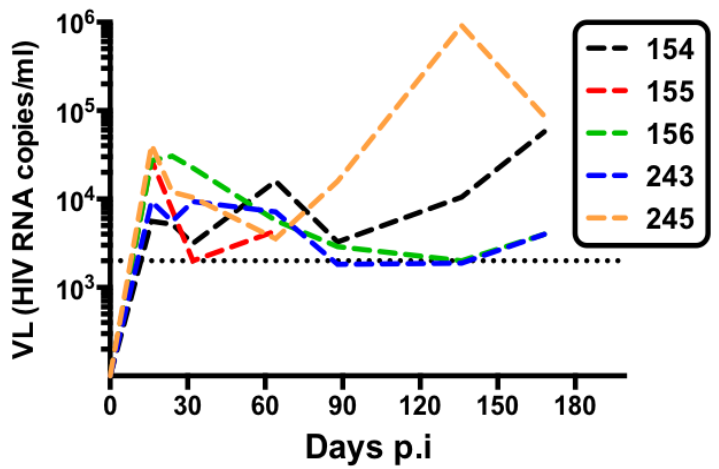


1.2

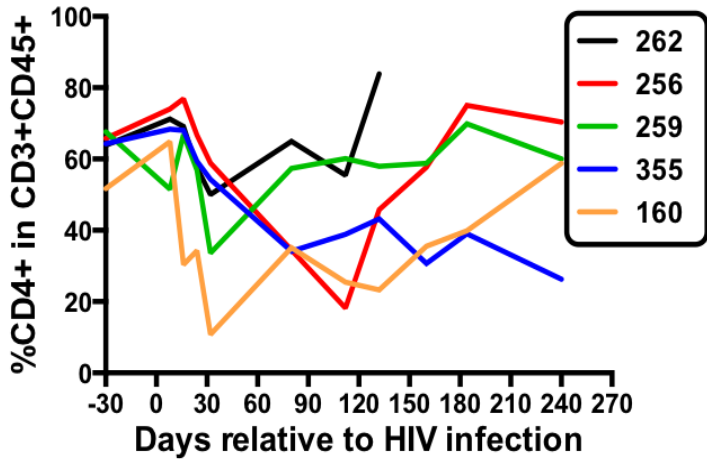
1.4



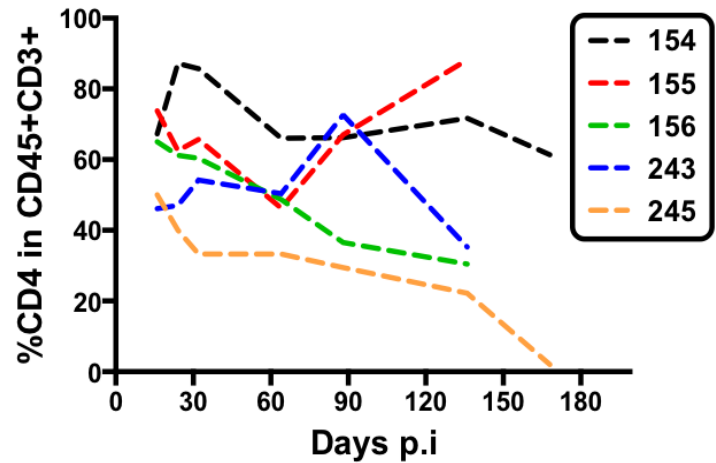
12.7



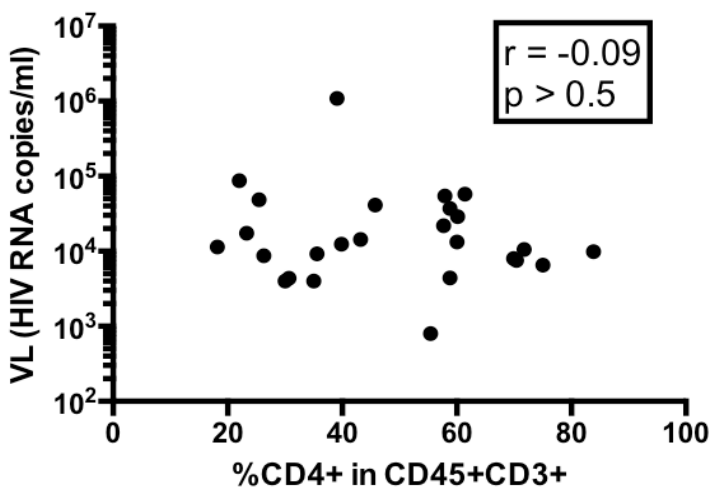
32.0



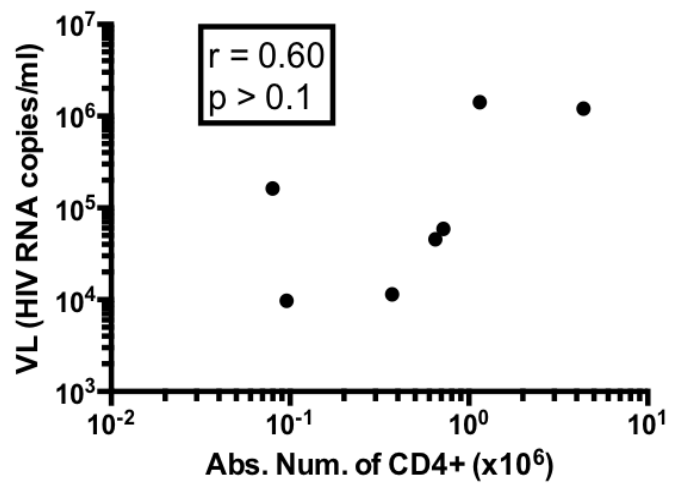
CD4



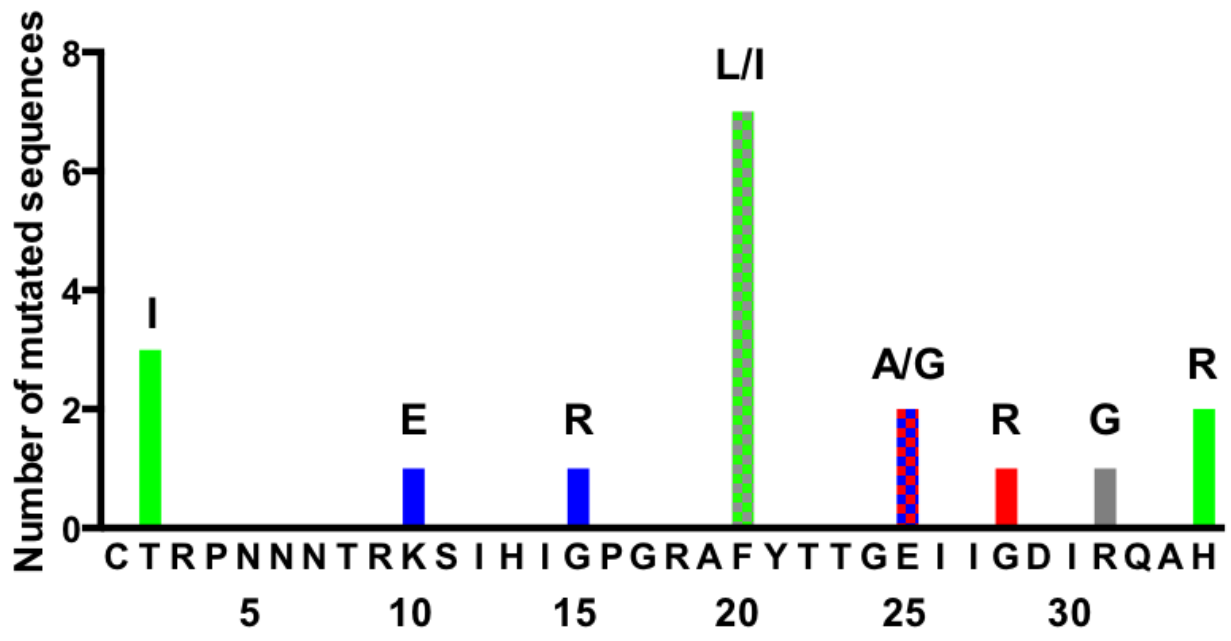
FMO



CCR5

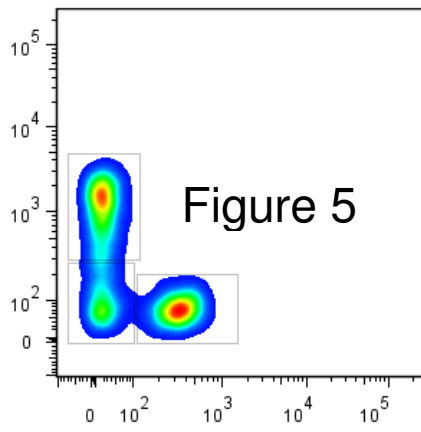


0.8

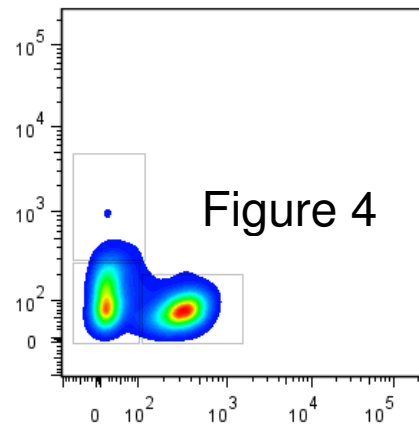


E

CD8

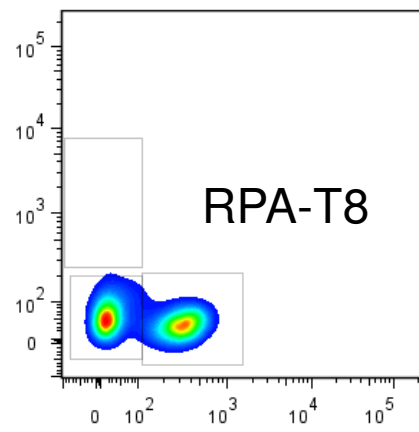
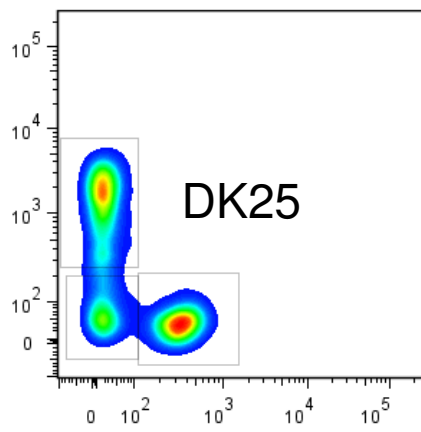


2.1

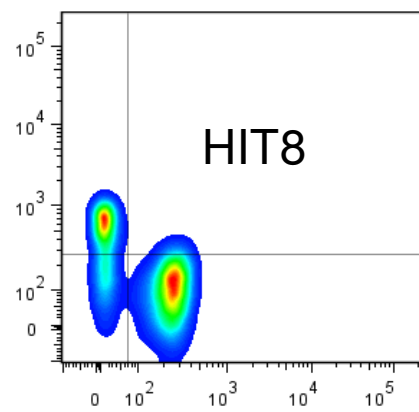
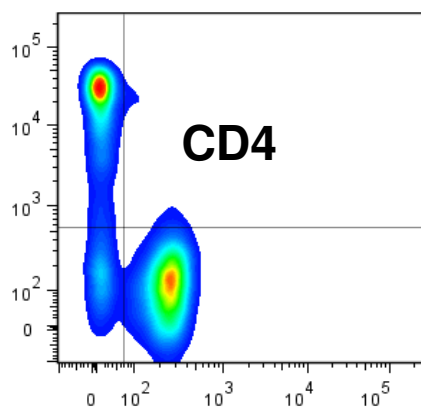


C

B



F



D

A

43.1

Article 2: Targeting both viral and host determinants of HIV entry using a new lentiviral vector co-expressing the T20 fusion inhibitor and a selective CCL5 intrakine (Article accepté en juillet 2014).

De nombreuses stratégies sont à l'étude de par le monde afin de trouver des thérapies curatives, dans l'objectif de s'affranchir des traitements antirétroviraux. Un des axes majeurs exploré est l'induction de cellules résistantes au virus du VIH. Une des cibles les plus prometteuses est le corécepteur CCR5, protéine G couplée au récepteur des chimiokines CCL5, MIP-1 a et b, utilisé lors de la transmission naturelle du virus par l'hôte infecté. La mutation $\Delta 32$ du gène CCR5 entraîne la formation d'un corécepteur non fonctionnel et à l'état homozygote elle confère une résistance à l'infection par les virus de tropisme R5. Un argument fort supplémentaire est le patient de Berlin, qui est le seul cas avéré d'une guérison de son infection par le VIH. Ce patient, infecté par le VIH, a reçu une greffe de moelle osseuse issue d'un donneur CCR5 $\Delta 32$, suite à une leucémie myéloïde aiguë. Quatre ans après la greffe et en absence de traitement antirétroviral, aucun virus circulant n'est détecté. De nombreuses approches tentent de mimer cette mutation $\Delta 32$ en inhibant l'expression fonctionnelle du CCR5, via des siRNA; des ribozymes; des intrakines; ou encore des nucléases à doigts de zinc. La disparition du CCR5 à la surface des cellules bloque une des étapes critiques de l'infection. D'autres étapes peuvent être également ciblées comme la fusion du virus et de la cellule.

Dans cette étude *in vitro*, nous démontrons l'efficacité d'une nouvelle combinaison de gènes anti VIH sur une lignée lymphoblastoïde humaine (CEMR5) susceptible à l'infection par le VIH, ainsi que sur des cellules primaires humaines isolées d'individus sains. Dans un premier temps nous avons validé l'expression du peptide C46 et la modulation du corécepteur CCR5 sur la lignée CEMR5 et sur des lymphocytes T CD4 humains. Sur ces cellules, nous avons également démontré qu'un fort niveau d'expression des transgènes entraînait l'inhibition de la réplication virale pour deux souches à tropisme R5. De plus, l'expression combinée des transgènes dans les cellules permet une protection supérieure en comparaison avec une expression simple, contre la réplication virale, démontrant ainsi une synergie d'action entre ces deux gènes anti-VIH. Finalement, ces transgènes confèrent aux cellules CEMR5 ainsi qu'aux lymphocytes T CD4 humains, une protection contre les effets cytopathiques du virus se traduisant par un avantage sélectif des cellules transduites *in vitro*.

L'ensemble de ces résultats a fait l'objet d'une publication dans le journal « Human gene therapy methods » publication acceptée courant juillet

HUMAN GENE THERAPY METHODS 25:232–240 (August 2014)
© Mary Ann Liebert, Inc.
DOI: 10.1089/hgtb.2014.034

Targeting Both Viral and Host Determinants of Human Immunodeficiency Virus Entry, Using a New Lentiviral Vector Coexpressing the T20 Fusion Inhibitor and a Selective CCL5 Intraikine

Nicolas Petit,^{1–3} Karim Dorgham,^{1–3} Béatrice Levacher,⁴ Aude Burlion,^{1–3}
Guy Gorochov,^{1,2,5,*} and Gilles Marodon^{1–3,*}

Abstract

Numerous strategies targeting early and late steps of the HIV life cycle have been proposed for gene therapy. However, targeting viral and host determinants of HIV entry is the only strategy that would prevent viral DNA-mediated CD4⁺ cell death while diminishing the possibility for the virus to escape. To this end, we devised a bicistronic lentiviral vector expressing the membrane-bound form of the T20 fusion inhibitor, referred to as the C46 peptide, and a CCR5 superagonist, modified to sequester CCR5 away from the cell surface, referred to as the P2-CCL5 intraikine. We tested the effects of the vector on HIV infection and replication, using the human CEMR5 cell line expressing CD4 and CCR5, and primary human T cells. Transduced cells expressed the C46 peptide, detected with the 2F5 monoclonal antibody by flow cytometry. Expression of the P2-CCL5 intraikine correlates with lower levels of cell surface CCR5. Complete protection against HIV infection could be observed in cells expressing the protective transgenes. Importantly, we show that the combination of the transgenes was more potent than either transgene alone, showing the interest of expressing two entry inhibitors to inhibit HIV infection. Last, genetically modified cells possessed a selective advantage over nonmodified cells on HIV challenge *in vitro*, showing that modified cells were protected from HIV-induced cell death. Our results demonstrate that lentiviral vectors coexpressing the T20 fusion inhibitor and the P2-CCL5 intraikine represent promising tools for HIV gene therapy.

Introduction

HUMAN IMMUNODEFICIENCY VIRUS entry involves sequential binding, first with the CD4 receptor and next with a chemokine coreceptor, CCR5 or CXCR4. A 32-bp deletion in the *CCR5* gene ($\Delta 32$) confers resistance to HIV infection in homozygotes (Deng *et al.*, 1996). A hematopoietic stem cell (HSC) transplant for acute myeloid leukemia (AML) in an HIV-infected patient was performed, using allogeneic cells from a CCR5 $\Delta 32$ donor (Hutter *et al.*, 2009). This study showed for the first time that a cure for HIV infection was possible and further highlighted the interest of targeting CCR5 through a gene therapy approach (Allers *et al.*, 2011).

Various strategies have been proposed to disrupt CCR5 expression: one targets directly the *CCR5* gene with zinc finger nucleases (ZFNs) and induces stable deletions in the *CCR5* gene that prevent expression of the molecule at the cell surface (Perez *et al.*, 2008). This has been shown to prevent CD4⁺T cell depletion, but not viral replication, in humanized mice (Holt *et al.*, 2010). This strategy is currently being tested in a phase 1 clinical trial using gene-modified T cell transfer (Tebas *et al.*, 2014). Another approach relies on CCR5-specific short hairpin RNA (shRNA) (Qin *et al.*, 2003). A significant effect on HIV replication of a CCR5-specific shRNA was observed if combined with TRIM5 α (tripartite motif-5 α) and *trans*-activation response

¹Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, CR7, Centre d'Immunologie et des Maladies Infectieuses (CIMI), F-75013, Paris, France.

²INSERM, U1135 (CIMI), Paris F-75013, France.

³CNRS, ERL 8255 (CIMI), Paris F-75013, France.

⁴INSERM U959, Paris F-75013, France.

⁵Service Immunologie, Hôpital Pitié-Salpêtrière, AP-HP, Paris F-75013, France.

*Joint co-authorship.

(TAR) element decoy genes (Walker *et al.*, 2012). However, a clinical trial to determine safety, using a similar strategy targeting early and late steps of the viral life cycle, failed to show any improvements in immunological or virological parameters (DiGiusto *et al.*, 2010). Thus, although effective *in vitro*, *in vivo* results, either in animal models or clinical trials, failed to fulfill expectations. Additional HIV gene therapy strategies and tools must therefore be devised and tested.

Apart from genetic knockouts, another possibility to modulate CCR5 at the cell surface is to target the CCR5 protein by intracellular antibody (Swan *et al.*, 2006) or intracellular chemokine (intrakine) gene delivery (Yang *et al.*, 1997). These strategies reduce CCR5 at the cell surface but do not completely abolish expression. Molecular evolution of CCL5 *in vitro* led to selection of the P2-CCL5 polypeptide, endowed with higher affinity and selectivity for CCR5 than parental CCL5. The soluble P2-CCL5 compound is a potent inhibitor of HIV entry *in vitro* (Hartley *et al.*, 2003; Jin *et al.*, 2010). We engineered a P2-CCL5 intrakine bearing a KDEL sequence that allows its specific compartmentalization into the granular endoplasmic reticulum (GER). Sequestration of the protein into the GER should reduce CCR5 expression from the cell surface and thus directly impact the sensitivity of modified cells to HIV infection.

The C46 peptide is derived from the clinically approved gp41-analog peptide fusion inhibitor T20 (enfuvirtide) (Hildinger *et al.*, 2001). Primary human CD4⁺ T cells modified by a self-inactivating lentiviral vector encoding the C46 peptide were protected from HIV infection *in vitro* (Egelhofer *et al.*, 2004; Perez *et al.*, 2005). Furthermore, a synergistic effect of T20 and low levels of CCR5 was demonstrated (Heredia *et al.*, 2007). We thus reasoned that coexpression of the P2-CCL5 intrakine with the C46 entry inhibitor should lead to better protection against HIV infection. In the present study, we developed a lentiviral vector combining the C46 peptide with the P2-CCL5 intrakine to improve antiviral efficacy and reduce the likelihood for escape variants to emerge. Our results show that genetically modified cells were protected from HIV infection and thus were conferred a selective advantage *in vitro* over nontransduced cells. Our results confirm that targeting viral and host determinants represents a promising strategy for HIV gene therapy.

Materials and Methods

Cell culture

HEK-293T/17 cells (CRL-11268; American Type Culture Collection [ATCC], Manassas, VA) were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 2 mM L-glutamine, penicillin (100 U/ml), streptomycin (100 µg/ml) (Life Technologies, Cergy-Pontoise, France), and 10% heat-inactivated fetal calf serum (FCS). CEM.NKR-CCR5 cells (CEMR5, cat. no. 4376; obtained from the AIDS Research Reagent Program, Germantown, MD) were cultured in RPMI 1640 supplemented with 10% FCS and antibiotics. Primary human cells were obtained from leukapheresis samples collected from healthy donors after informed consent had been obtained. Cells were grown at a concentration of 1×10^6 cells/ml and activated in RPMI, FCS,

antibiotics, interleukin-2 (Proleukin, 60 IU/ml; Novartis, Basel, Switzerland), and CD3/CD28 beads (CTS Dynabeads CD3/CD28; Invitrogen, Carlsbad, CA) at 3 beads per cell. Cells were transduced with the indicated lentiviral vectors 3 days after activation and infected with HIV 3–5 days after transduction.

Lentiviral vector design and production

Second-generation self-inactivating (SIN) lentiviral vectors were used in this study. The cassette encoding the C46 peptide was kindly provided by D. von Laer (Innsbruck University, Innsbruck, Austria) and was cloned into pRRLsin.cPPT.hPGK (kind gift from Dr. L. Naldini, TIGET, San Raffaele Telethon Institute for Gene Therapy, San Raffaele Scientific Institute, Milan, Italy) to generate the Lv93 vector. The P2-CCL5 intrakine was constructed by PCR from the previously described phagemid vector (Hartley *et al.*, 2003). The P2-CCL5 analog was linked at the N terminus with the CCL5 leader sequence, using an *Nco*I-tailed forward primer, and at the C terminus with an HA tag (YPYDVPDYA) and an endoplasmic reticulum (ER) retention signal (KDEL), using an *Xho*I-tailed reverse primer. The resulting P2-CCL5 intrakine (P2i) was further cloned into the lentiviral vector pRRLsin.PPT.hPGK to generate the Lv114 vector. The C46 coding sequence consists of the T20 sequence fused with the CD34 membrane-spanning domain separated by the human IgG2 hinge (Hildinger *et al.*, 2001). The C46-2A-P2i bicistronic sequence was synthesized (GenScript, Piscataway, NJ) and inserted into the *Bam*HI/*Sal*I sites in pRRLsin.PPT.hPGK or into the pRRLsin.PPT.EF1 α plasmid (described in Dupuy *et al.*, 2005) to generate the Lv163 and Lv203 vectors, respectively. Details on the cloning procedures are available on request. Lentiviral vectors were produced in HEK-293T cells, as described (Marodon *et al.*, 2003). Briefly, 23.3 µg of the Δ 8.9 packaging plasmid, 30 µg of the transgene plasmid, and 10 µg of the vesicular stomatitis virus (VSV)-G envelope were transfected into 15×10^6 cells in T-175 flasks by calcium phosphate precipitation. Vector supernatants were collected 48 hr posttransfection and concentrated by ultrafiltration (Centricon Plus-70; Millipore, Molsheim, France) at $3500 \times g$ at 4°C. Viral stocks were kept frozen at -80°C . Viral titers were determined on HEK-293T cells with various concentrations of vector supernatants in the presence of Polybrene (8 µg/ml; Sigma-Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France). Seventy-two hours after transduction, the percentage of cells expressing the transgenes was determined by flow cytometry and used to calculate a viral titer as the number of infectious particles per milliliter. Transductions of cells were performed with cell numbers and multiplicities of infections (MOIs) as indicated in the figure legends in the presence of Polybrene (8 µg/ml; Sigma-Aldrich).

HIV strains

HIV-1 molecular clones NL4D8 and Yu2 were obtained through the AIDS Research and Reference Reagent Program (gift from A. Moris, Centre Immunologie et Maladies Infectieuses, Paris, France). HIV stocks were prepared with 30 µg of HIV plasmid transfected into 15×10^6 293T cells in T-175 flasks by calcium phosphate

precipitation. Supernatants were collected 48 hr post-transfection and frozen at -80°C . Viral titers (ng/ml) were determined by p24 ELISA with standard and unknowns measured in duplicate (Retrotek; ZeptoMetrix, Buffalo, NY).

Flow cytometry and cell sorting

Cells were washed twice in $1\times$ phosphate-buffered saline (PBS) and stained with the cell viability dye eFluor 780 (eBioscience, San Diego, CA). The following monoclonal antibodies were used for cell surface staining: anti-CCR5 conjugated with allophycocyanin (APC) (2D7; BD Biosciences, Pont-de-Claix, France), anti-CD4 conjugated with peridinin chlorophyll protein complex (PerCP) (RPAT-4; BioLegend/Ozyme, Saint-Quentin-en-Yvelines, France), and the human IgG1 2F5 monoclonal antibody (mAb) directed to the EDLKW gp41 epitope (Polymun, Klosterneuburg, Austria). Cells were washed and stained with a phycoerythrin (PE)-conjugated goat anti-human IgG antibody (Caltag/Life Technologies [Burlingame, CA] or Jackson ImmunoResearch [West Grove, PA]) to reveal 2F5 binding. For detection of the P2-CCL5 intrakine, cells were treated with brefeldin A for 2 hr, washed, fixed, and permeabilized for 20 min with an intracellular fixation & permeabilization buffer kit (eBioscience). Cells were stained with biotinylated anti-CCL5 mAb (R&D Systems, Lille, France) and revealed with streptavidin conjugated with PE-Cy7. All samples were acquired on an LSR II flow cytometer (BD Biosciences). Frequencies and median of fluorescence intensity (MFI) of positive cells were analyzed with FlowJo software (Tree Star, San Carlos, CA). Positivity was set according to the fluorescence minus one (FMO) control, in which staining incorporating all antibodies minus the one of interest are compared with staining with a complete set of antibodies. For cell-sorting experiments, Lv163-transduced CEM-R5 cells were stained with 2F5 and PE-labeled secondary antibody 21 days after transduction. Cell sorting of 2F5^{bright} cells was performed on a FACSAria cell sorter (BD Biosciences).

DNA extraction and HIV PCR

We used a PureLink genomic DNA mini kit (Invitrogen, Saint Aubin, France) for DNA extraction. To detect HIV in a semiquantitative fashion, the SK38 and SK39 primers were used to detect *gag* viral DNA, and HLA-DQ-specific DQ28 and DQ29 were used to quantify total cellular DNA in the same tube, as described (Marodon *et al.*, 1999). PCR conditions were as follows: 1 cycle at 94°C for 3 min; followed by 30 cycles at 94°C for 30 sec, 60°C for 30 sec, and 72°C for 30 sec; with a final extension cycle at 72°C for 10 min. Fractions ($15\ \mu\text{l}$) of each PCR were run on a 4% agarose gel (Invitrogen) and analyzed on Quantum ST4 camera for gel electrophoresis (Vilber Lourmat, Marne-la-Vallée, France).

Statistical analysis

Two-tailed *p* values were calculated with Prism version 6.0 software (GraphPad Software, San Diego, CA) for the Mac, using a parametric unpaired *t* test with a confidence interval of 95%.

Results

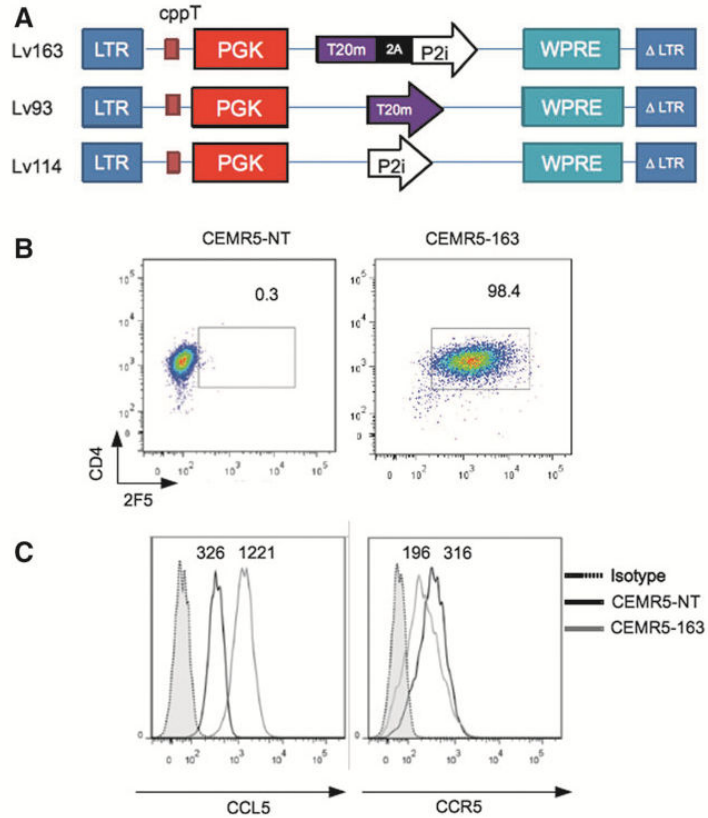
Lentiviral vector designed to interfere with both viral and host determinants of HIV entry

A series of mono- and bicistronic second-generation self-inactivated lentiviral vectors was constructed (Fig. 1A). Notably, we generated the Lv163 bicistronic lentiviral vector coexpressing the C46 peptide and the P2-CCL5 intrakine (P2i) under the control of the phosphoglycerate kinase (PGK) promoter (Fig. 1A). In our vectors, therapeutic cassette expression can be directly monitored by flow cytometry, using the 2F5 antibody, which binds to the C46 peptide (Hildinger *et al.*, 2001). To facilitate the initial studies, we sorted Lv163-transduced CEMR5 cells on the basis of 2F5 staining by fluorescence-activated cell sorting (FACS) to generate CEMR5 cells expressing high and stable levels of C46 (CEMR5-163 cells) (Fig. 1B). CEMR5-163 cells expressed higher intracellular levels of CCL5 than did parental CEMR5 cells (Fig. 1B), showing that staining for CCL5 detected P2i as well. A lower level of expression of CCR5 was observed at the cell surface of CEMR5-163 cells compared with parental CEMR5 cells, showing that expression of intracellular P2i correlated with reduced cell surface CCR5 expression (Fig. 1B).

Bicistronic lentiviral vectors expressing C46 fusion inhibitor and CCL5 intrakine prevent HIV infection

We next determined whether the high-level C46 expression and low-level CCR5 expression that we observed on the CEMR5-163 cell line described previously would have any impact on HIV infection. For this, we challenged CEMR5-163 or control CEMR5 cells with two different strains of HIV (the R5-tropic NL4D8 and Yu2 strains) and monitored HIV infection overtime by p24 ELISA in the supernatant and by HIV *gag*-specific DNA PCR at the end of the culture (Fig. 2). Control cells exhibited high levels of p24 (up to 1×10^5 pg/ml of supernatant from day 7 to day 11 postinfection) irrespective of the viral strain. Undetectable or low levels of p24 were measured in CEMR5-163 cells infected with NL4D8 virus (50 ng of p24), showing that expression of the transgenes had a protective effect at this dose of p24. This was confirmed by the lack of detectable provirus in challenged cultures (Fig. 2B), showing that expression of the transgenes provided complete protection. At the same dose, the Yu2 strain was more aggressive because CEMR5 control cells were all dead by day 10 from cytopathic effect (data not shown). Compared with controls, there was some viral replication detected in the culture infected with the Yu2 virus at 50 ng of p24, as evidenced by p24 detection on day 7 and day 11 postinfection (Fig. 2C). However, CEMR5-163 cells were entirely protected from viral infection if infectious doses of Yu2 were reduced to 0.5 ng of p24, whereas HIV was still detectable and highly pathogenic in control cells at this dose (Fig. 2D). Low p24 production in transduced cells could be due to increase cell death after HIV challenge. To the contrary, analysis with the viability dye included in our staining showed that the number of live cells dropped only in nontransduced cells, probably owing to HIV-related cell death (data not shown). Altogether, these results demonstrate that the lentiviral vector Lv163 protected genetically modified cells from infection.

FIG. 1. A lentiviral vector designed to interfere with both viral and host determinants of HIV entry. **(A)** Schematic representation of the structure of the lentiviral vectors used in this study. LTR, long terminal repeat; cPPT, central polypurine tract of HIV; PGK, phosphoglycerate kinase promoter; T20m, membrane-bound form of T20 (C46 peptide); 2A, 2A sequence of the foot-and-mouth disease virus; P2i, P2-CCL5 intrakine (CCR5 superagonist); WPRE, woodchuck hepatitis virus regulatory element; ΔLTR, U3-deleted LTR. Indicated is the reference of the vector used throughout the study. Diagram is not to scale. **(B)** Expression of C46 peptide detected by 2F5 antibody in nontransduced cells (CEMR5-NT) and CEMR5 cells after transduction with the Lv163 vector and sorting (CEMR5-163). Percentages of positive cells are indicated on the profiles. **(C)** CCL5 expression and CCR5 expression in CEMR5 cells were assessed separately. The numbers above the profiles represent the median of fluorescence intensity (MFI) of the reported molecules according to the experimental conditions indicated in the legends (CEMR5-NT, nontransduced; Isotype, isotype control stained cells). Color images available online at www.liebertpub.com/hgtb

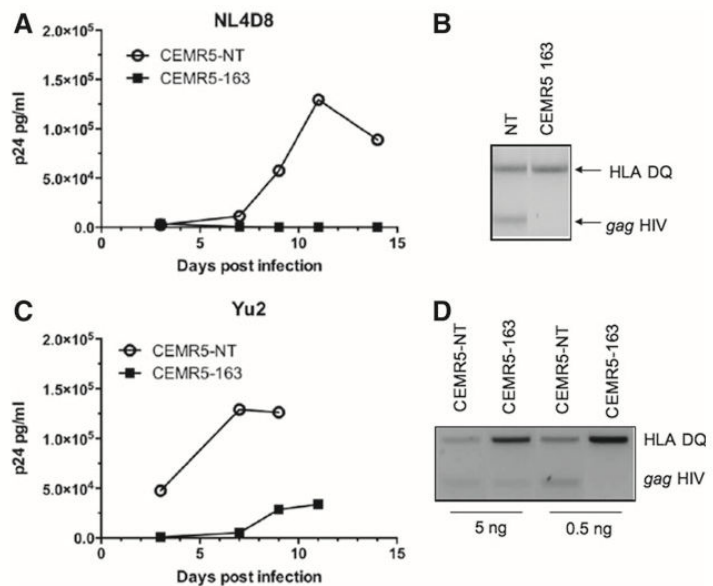


C46 fusion inhibitor and P2-CCL5 intrakine act in synergy to inhibit HIV infection

To document the advantage of coexpressing the P2-CCL5 intrakine and the C46 peptide, we tested the synergy of the

transgenes in the inhibition of HIV infection. For this, we sorted CEMR5 cells expressing low levels of CCR5 after transfection with the Lv114 plasmid (CEMR5-114 in Fig. 3A). Low levels of CCR5 did not confer protection against HIV challenge, as monitored by p24 and gag detection (Fig. 3B and

FIG. 2. Bicistronic lentiviral vectors expressing C46 fusion inhibitor and CCL5 intrakine prevent HIV infection. **(A)** CEMR5-163 cells (3×10^5) were challenged with NL4D8 HIV (50 ng of p24). Viral replication is indicated by p24 detection in nontransduced cells (CEMR5-NT) and CEMR5-163 cells, as described in text. **(B)** PCR detection of HIV gag and HLA-DQ DNA on day 14 after infection under the indicated conditions. **(C)** CEMR5-163 cells or CEMR5-NT cells (nontransduced) (3×10^5) were challenged with Yu2 virus (50 ng of p24) and viral replication was monitored by p24 ELISA. **(D)** PCRs specific for HIV gag and HLA-DQ DNA were performed 24 days after infection with decreasing doses of HIV Yu2 as indicated. Results shown in (A–C) are from the same experiment whereas the PCR shown in (D) originated from an independent experiment.



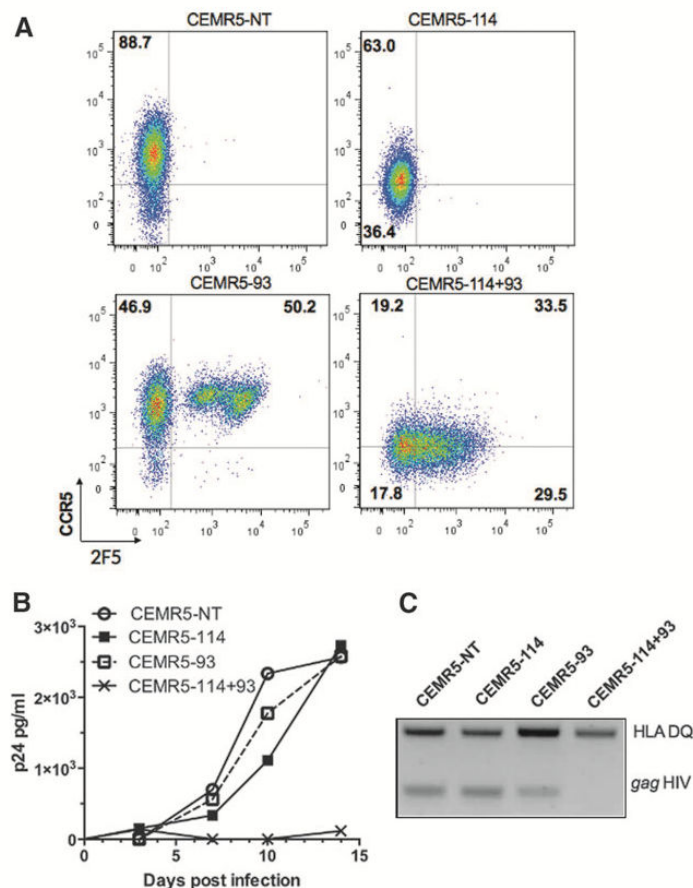


FIG. 3. The C46 fusion inhibitor and the P2-CCL5 intrakine act in synergy to inhibit HIV infection. (A) Fluorescence-activated cell-sorting (FACS) profile showing expression of the C46 peptide and CCR5 in control CEMR5 cells (*top left panel*) or after transfection with the Lv114 plasmid and sorted on the basis of CCR5 expression (CEMR5-114 cells, *top right panel*). FACS profile showing expression of C46 and CCR5 in CEMR5 cells (*bottom left panel*) and CEMR5-114 cells (*bottom right panel*) after transduction with the Lv93 vector. Percentages are indicated on the profiles for each quadrant. (B) p24 production in CEMR5 cells in the indicated culture conditions. CEMR5-NT (non transduced), CEMR5-114 (CCR5^{lo} cells), CEMR5-114+93 (CCR5^{lo} cells + transduction with the Lv93 vector) CEMR5-93: parental CEMR5 cells transduced by the Lv93 vector. (C) HIV gag and HLA-DQ specific DNA PCR were performed at the end of the indicated cultures. Color images available online at www.liebertpub.com/hgtb

C). However, transduction of these CEMR5-114 cells with the monocistronic lentiviral vector Lv93 (CEMR5-114+93 in Fig. 3A) led to complete protection, whereas cultures of CEMR5 cells containing 50% of C46⁺ cells (CEMR5-93 in Fig. 3A) were not protected (Fig. 3B). Thus, low CCR5 expression and 50–60% of C46 expression, two conditions in which cells were not protected, conferred protection to HIV infection if combined together.

Selective advantage for CEMR5 cells expressing C46 fusion inhibitor and P2-CCL5 intrakine

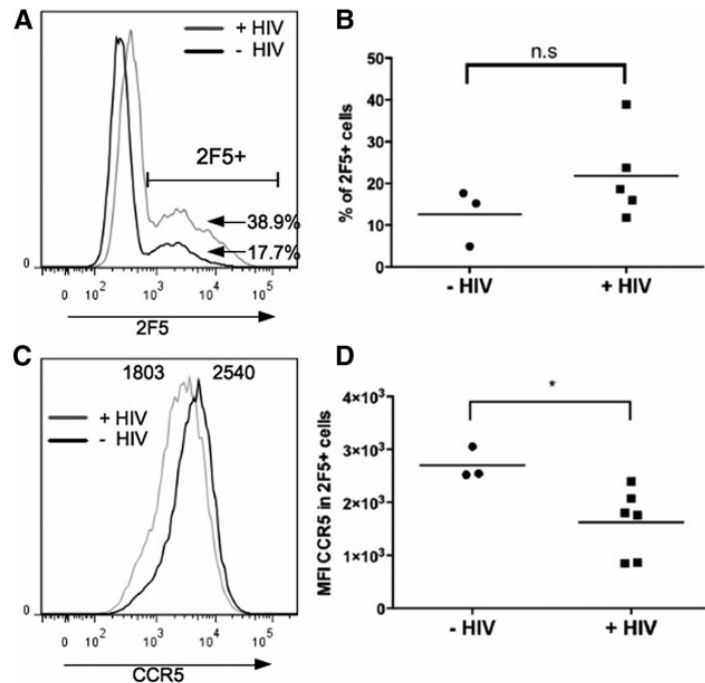
Our results so far demonstrate that the combination of two viral entry inhibitors could prevent HIV infection. We next asked whether this protection could prevent HIV-induced cell death and thus lead to better growth compared with non-protected cells, a process that we referred to as a selective advantage. For that, gene-modified CEMR5 cells were infected or not with the R5-tropic HIV strain NL4D8 or Yu2, and the frequencies of 2F5⁺ cells and the median of fluorescence intensity (MFI) of CCR5 in 2F5⁺ cells were determined at the end of culture. A significant increase in the frequencies of 2F5⁺ cells was observed when HIV-infected cultures were compared with noninfected ones (Fig. 4A). Overall, there was

a 2.1-fold increase in the proportions of 2F5⁺ cells in cultures in the presence of HIV (Fig. 4B). We assessed whether 2F5⁺ cells would also be enriched in CCR5^{lo} cells, as expected from the action of the P2-CCL5 intrakine. Indeed, the MFI of CCR5 was lower on 2F5⁺ cells in cultures infected with HIV compared with noninfected cultures (Fig. 4C and D). Altogether, these results demonstrate that 2F5⁺CCR5^{lo} CEMR5 cells were enriched on HIV infection *in vitro*. These results converge to show that expression of the therapeutic transgenes conferred a selective advantage to gene-modified cells.

Expression of C46 peptide and of P2-CCL5 intrakine efficiently protects primary human CD4⁺ T cells from infection

To determine whether the therapeutic transgenes would have similar effects on primary human CD4⁺ T cells, the natural target for HIV, we transduced activated peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) with a new lentiviral vector in which the elongation factor-1 α (EF1 α) promoter replaces the PGK promoter (Fig. 5A). Cultures were then challenged with two different HIV strains at two different doses. Transduction of PBMCs at an MOI of 40 led to reproducible expression of the C46 peptide in 60–80% of the cells

FIG. 4. Selective advantage for CEMR5 cells expressing C46 fusion inhibitor and P2-CCL5 intrakine. **(A)** Frequencies of 2F5⁺ cells 10 days with (+HIV) or without (-HIV) challenge with NL4D8 HIV (50ng of p24). Percentages of 2F5⁺ cells are indicated on the graph. **(B)** CEMR5 cells transduced with the Lv163 vector were challenged with NL4D8 HIV (10 or 50ng of p24). Results represents the frequencies of 2F5⁺ cells in CD4⁺ cells (dead cells excluded) determined by flow cytometry from day 10 to day 14 after infection. Results are compiled from two independent experiments (n.s., not significant). **(C)** Median intensity (MFI) of CCR5 in 2F5⁺ cells 10 days after challenge with (+HIV) or without (-HIV) NL4D8 virus (50ng of p24). Numbers on the graph indicate the MFI of CCR5 in live CD4⁺2F5⁺ cells for each histogram. **(D)** MFI of CCR5 in live CD4⁺2F5⁺ CEMR5 cells transduced with the Lv163 vector 10 days after challenge (+HIV) or not (-HIV) with NL4D8 or Yu2 virus (50ng of p24) (**p* < 0.05).



(Fig. 5B). Expression of P2-CCL5 was not monitored because activated human CD4⁺ T cells express high levels of CCL5, rendering difficult the detection of the vector-encoded CCL5 by flow cytometry (data not shown). However, prevention of CCR5 expression at the surface of 2F5⁺ cells was readily observed, indirectly showing that the P2-CCL5 intrakine affected CCR5 expression in primary T cells (Fig. 5C). A marked difference in p24 was observed when protected cultures were compared with mock-transduced cells, showing that expression of the transgenes affected viral replication (Fig. 5D). Furthermore, under conditions in which the number of 2F5⁺ cells was set to lower frequencies by diluting transduced into nontransduced cells, a progressive increase in 2F5⁺ cells was observed in HIV-infected relative to noninfected cultures, showing that transduced cells possessed a selective advantage over nonprotected cells (Fig. 5E).

Discussion

We devised a lentiviral vector expressing a combination of two HIV entry inhibitors to reduce the risks of viral escape and improve the likelihood for selective advantage. The combination of two entry inhibitors might be particularly interesting in view of data showing that the mere presence of viral DNA before integration might be the initiator of CD4⁺ T cell death, the initial event in the development of AIDS (Doitsh *et al.*, 2014). Thus, we believe that gene therapy and vaccines should aim toward the same goal, that is, preventing the virus from getting into the CD4⁺ T cell.

HIV gene therapy has moved from single agents to combinatorial approaches targeting various steps of the viral cycle (Peterson *et al.*, 2013). For instance, a lentiviral vector

including a CCR5 shRNA, a chimeric TRIM5 α molecule, and a TAR decoy has been developed (Anderson *et al.*, 2007) and promising results were published in humanized mice although the strategy failed to impact viral loads (Walker *et al.*, 2012). However, the functional impact of overexpressing TRIM5 α , APOBEC (apolipoprotein B mRNA-editing enzyme, catalytic polypeptide-like), or other mRNA-editing molecules has not been tested. In the vector described here, we took care not to incorporate mRNA-editing molecules, or potential immunogens or proinflammatory molecules, that might prevent gene transfer efficacy or lead to unforeseeable side effects. Indeed, several reports attest that small interfering RNAs (siRNAs) might initiate a proinflammatory response *in vivo* (Judge *et al.*, 2005; Robbins *et al.*, 2008). Zinc finger nucleases might induce a complete loss of CCR5 and/or CXCR4 expression in targeted cells (Holt *et al.*, 2010; Didigu *et al.*, 2014) but the side effects of that protocol, such as off-target cleavage (Pattanayak *et al.*, 2011), alteration of hematopoiesis, or homing properties for modified cells, still need to be fully evaluated. We chose a less aggressive strategy allowing residual expression of CCR5 on the cell surface. A partial downregulation of CCR5 expression alone might not be enough to completely protect CD4⁺ T cells from infection but we show that it significantly increased the potency of the C46 peptide fusion inhibitor. This observation suggests that complete knockout of CCR5 might not be needed if modulation of CCR5 is combined with other therapeutic transgenes. Furthermore, the P2-CCL5 intrakine remains closely related to the self-derived CCL5, and is therefore unlikely to elicit a strong immune response. The C46 peptide is also a good candidate for gene therapy because it is derived from an already approved medication.

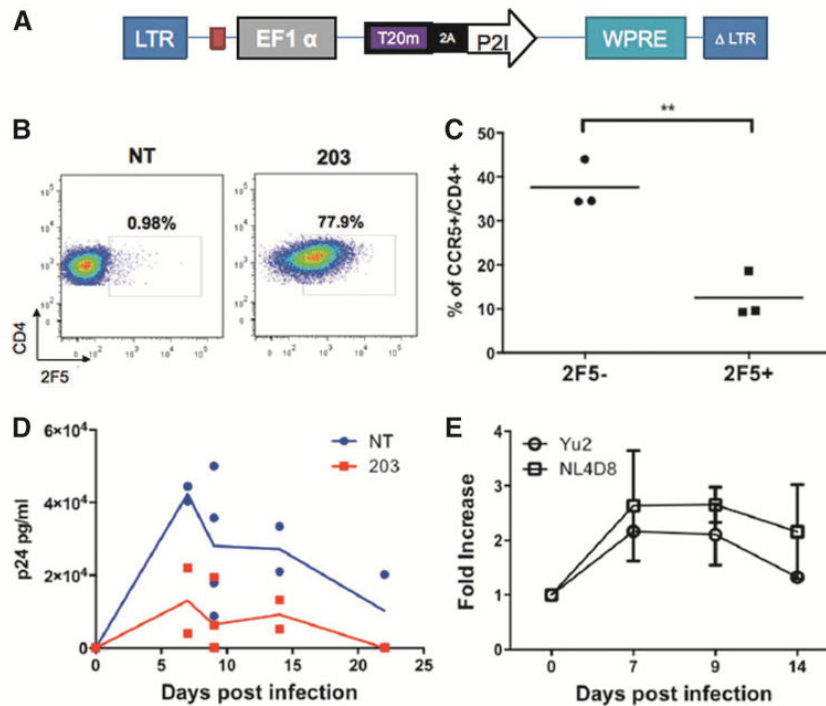


FIG. 5. Expression of C46 peptide and of P2-CCL5 intrakine efficiently protects primary human CD4⁺ T cells from infection. **(A)** A lentiviral vector coexpressing C46 peptide and P2-CCL5 intrakine was derived from the LvEF1 α -GFP vector and is referred to as Lv203. **(B)** Expression levels of C46 peptide on anti-CD3/CD28-activated human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) 3 days after transduction with the Lv203 vector at an MOI of 40. Cells were stained for C46 expression with the 2F5 monoclonal antibody (mAb) and revealed with a secondary anti-human mAb labeled with phycoerythrin. NT, nontransduced. **(C)** Frequencies of CCR5⁺ cells gated in CD4⁺2F5⁺ cells, as defined in **(B)**, were determined by flow cytometry 22–23 days after transduction on CD3/CD28-activated PBMC cultures from three different donors in two independent experiments (** $p < 0.05$). **(D)** HIV replication was monitored by p24 ELISA from the supernatant of CD4⁺ T cells HIV-infected cultures, either mock transduced (NT, nontransduced) or transduced with the Lv203 vector after infection with either 0.5 or 25 ng of p24 (NL4D8 R5-tropic virus) on 5×10^5 or 1×10^6 cells, respectively. Results shown are cumulative of two independent experiments with four unrelated healthy donors. **(E)** Selective advantage of transduced CD4⁺ T cells at an MOI of 20 on infection with Yu2 or NL4D8 virus (25 ng of p24), as indicated. Transduced cells were diluted with mock-transduced cells from the same donor to fix the frequencies of transduced cells at 20% before infection. The fold change represents the ratio of 2F5⁺ cells determined by flow cytometry in HIV-infected versus noninfected cultures in one experiment with two healthy donors. Color images available online at www.liebertpub.com/hgtb

Despite the synergy between these two HIV inhibitors, we observed that gene-modified cells were not protected after challenge with high doses of the patient-derived HIV Yu2, in contrast to the molecular HIV construction NL4D8. The viral dose that a CD4⁺ T cell might encounter *in vivo* is likely to be lower than the dose used *in vitro*, in our challenge experiments. Nevertheless, one might think of adding another therapeutic transgene to the vector to improve efficacy. The HIV-inhibiting integrase-binding domain (IBD) of lens epithelium-derived growth factor/p75 might represent a useful adjunct in our vector (De Rijck *et al.*, 2006).

A major concern for antifusion therapeutic strategies is the rapid emergence of enfuvirtide-resistant variants (Greenberg and Cammack, 2004). However, it should be stressed that enfuvirtide-resistant HIV strains are still susceptible to membrane-bound C46 peptide (Egelhofer *et al.*, 2004), showing that the resistance to C46 is not equivalent to that

toward T20. Increasing local concentrations of T20 at the viral–cellular interface during fusion might be the cause of this improved efficacy. Of note is the fact that the C46 peptide is 10 amino acids longer than T20; that may also impact on the wider effect of C46 on T20-resistant HIV strains (Lohrengel *et al.*, 2005). In any case, our strategy targeting essential steps of viral infection (fusion and attachment to CCR5) is likely to reduce the possible emergence of doubly-resistant escape variants that are generated during retrotranscription.

Another important feature needed for successful HIV gene therapy will be the selective advantage conferred to modified lymphocytes. We observed a selective advantage *in vitro* with a 2.1-fold enrichment in 2F5⁺ CCR5^{lo} cells in HIV-challenged compared with noninfected cultures. Although this may appear modest, the selective advantage observed *in vitro* might be severely limited by indirect toxic

effects linked to massive cell death in culture. A 2.2-fold *in vivo* selective advantage was reported for CCR5 and CXCR4 double-knockout cells (Didigu *et al.*, 2014). A selective advantage has also been shown in humanized mice reconstituted with zinc finger-modified CD34⁺ progenitors (Holt *et al.*, 2010) or with CD4⁺ T cells modified to express the C46 peptide (Kimpel *et al.*, 2010). We are currently determining the selective advantage conferred by our vector to primary human T cells *in vivo* in advanced models of humanized mice. It will also be important to determine whether our protocol is able to significantly impact viral loads and CD4⁺ T cell deletion.

In summary, our results functionally validate a new gene transfer vector combining two HIV entry inhibitors. Further work is needed to appreciate the impact of this approach in preclinical models of HIV gene therapy.

Acknowledgments

This work was funded by the French National Agency for AIDS Research (ANRS). N.P. is a recipient for a doctoral fellowship from the SIDAction/Fond de Dotation Pierre Bergé. A.B. is the recipient of a doctoral fellowship from the Ministère de la Recherche et de l'Enseignement Supérieur. The authors thank Dr. D. von Laer for the kind gift of the C46 cassette, Dr. A. Moris for the kind gift of reagents, and Prof. D. Klatzmann for initial support of this project.

Author Disclosure Statement

No competing financial interests exist.

References

- Allers, K., Hütter, G., Hofmann, J., *et al.* (2011). Evidence for the cure of HIV infection by CCR5Δ32/Δ32 stem cell transplantation. *Blood* 117, 2791–2799.
- Anderson, J., Li, M.-J., Palmer, B., *et al.* (2007). Safety and efficacy of a lentiviral vector containing three anti-HIV genes—CCR5 ribozyme, *tat-rev* siRNA, and TAR decoy—in SCID-hu mouse-derived T cells. *Mol. Ther.* 15, 1182–1188.
- Deng, H., Liu, R., Ellmeier, W., *et al.* (1996). Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1 [see comments]. *Nature* 381, 661–666.
- De Rijck, J., Vandekerckhove, L., Gijsbers, R., *et al.* (2006). Overexpression of the lens epithelium-derived growth factor/p75 integrase binding domain inhibits human immunodeficiency virus replication. *J. Virol.* 80, 11498–11509.
- Didigu, C.A., Wilen, C.B., Wang, J., *et al.* (2014). Simultaneous zinc-finger nuclease editing of the HIV coreceptors CCR5 and CXCR4 protects CD4⁺ T cells from HIV-1 infection. *Blood* 123, 61–69.
- DiGiusto, D.L., Krishnan, A., Li, L., *et al.* (2010). RNA-based gene therapy for HIV with lentiviral vector-modified CD34⁺ cells in patients undergoing transplantation for AIDS-related lymphoma. *Sci. Transl. Med.* 2, 36ra43.
- Doitsh, G., Galloway, N.L.K., Geng, X., *et al.* (2014). Cell death by pyroptosis drives CD4 T-cell depletion in HIV-1 infection. *Nature* 505, 509–514.
- Dupuy, F.P., Mouly, E., Mesel-Lemoine, M., *et al.* (2005). Lentiviral transduction of human hematopoietic cells by HIV-1- and SIV-based vectors containing a bicistronic cassette driven by various internal promoters. *J. Gene Med.* 7, 1158–1171.
- Egelhofer, M., Brandenburg, G., Martinius, H., *et al.* (2004). Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 entry in cells expressing gp41-derived peptides. *J. Virol.* 78, 568–575.
- Greenberg, M.L., and Cammack, N. (2004). Resistance to enfuvirtide, the first HIV fusion inhibitor. *J. Antimicrob. Chemother.* 54, 333–340.
- Hartley, O., Dorgham, K., Perez-Bercoff, D., *et al.* (2003). Human immunodeficiency virus type 1 entry inhibitors selected on living cells from a library of phage chemokines. *J. Virol.* 77, 6637–6644.
- Heredia, A., Gilliam, B., DeVico, A., *et al.* (2007). CCR5 density levels on primary CD4 T cells impact the replication and enfuvirtide susceptibility of R5 HIV-1. *AIDS* 21, 1317–1322.
- Hildinger, M., Dittmar, M.T., Schult-Dietrich, P., *et al.* (2001). Membrane-anchored peptide inhibits human immunodeficiency virus entry. *J. Virol.* 75, 3038–3042.
- Holt, N., Wang, J., Kim, K., *et al.* (2010). Human hematopoietic stem/progenitor cells modified by zinc-finger nucleases targeted to CCR5 control HIV-1 *in vivo*. *Nat. Biotechnol.* 28, 839–847.
- Hutter, G., Nowak, D., Mossner, M., *et al.* (2009). Long-term control of HIV by CCR5 Δ32/Δ32 stem-cell transplantation. *N. Engl. J. Med.* 360, 692–698.
- Jin, H., Kagiampakis, I., Li, P., *et al.* (2010). Structural and functional studies of the potent anti-HIV chemokine variant P2-RANTES. *Proteins* 78, 295–308.
- Judge, A.D., Sood, V., Shaw, J.R., *et al.* (2005). Sequence-dependent stimulation of the mammalian innate immune response by synthetic siRNA. *Nat. Biotechnol.* 23, 457–462.
- Kimpel, J., Braun, S.E., Qiu, G., *et al.* (2010). Survival of the fittest: Positive selection of CD4⁺ T cells expressing a membrane-bound fusion inhibitor following HIV-1 infection. *PLoS One* 5, e12357.
- Lohrengel, S., Hermann, F., Hagemann, I., *et al.* (2005). Determinants of human immunodeficiency virus type 1 resistance to membrane-anchored gp41-derived peptides. *J. Virol.* 79, 10237–10246.
- Marodon, G., Warren, D., Filomio, M.C., *et al.* (1999). Productive infection of double negative T cells with HIV *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96, 11958–11963.
- Marodon, G., Mouly, E., Blair, E.J., *et al.* (2003). Specific transgene expression in human and mouse CD4⁺ cells using lentiviral vectors with regulatory sequences from the CD4 gene. *Blood* 101, 3416–3423.
- Pattanayak, V., Ramirez, C.L., Joung, J.K., *et al.* (2011). Revealing off-target cleavage specificities of zinc-finger nucleases by *in vitro* selection. *Nat. Methods* 8, 765–770.
- Perez, E.E., Riley, J.L., Carroll, R.G., *et al.* (2005). Suppression of HIV-1 infection in primary CD4 T cells transduced with a self-inactivating lentiviral vector encoding a membrane expressed gp41-derived fusion inhibitor. *Clin. Immunol.* 115, 26–32.
- Perez, E.E., Wang, J., Miller, J.C., *et al.* (2008). Establishment of HIV-1 resistance in CD4⁺ T cells by genome editing using zinc-finger nucleases. *Nat. Biotechnol.* 26, 808–816.

- Peterson, C.W., Younan, P., Jerome, K.R., *et al.* (2013). Combinatorial anti-HIV gene therapy: Using a multi-pronged approach to reach beyond HAART. *Gene Ther.* 20, 695–702.
- Qin, X.F., An, D.S., Chen, I.S., *et al.* (2003). Inhibiting HIV-1 infection in human T cells by lentiviral-mediated delivery of small interfering RNA against CCR5. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100, 183–188.
- Robbins, M., Judge, A., Ambegia, E., *et al.* (2008). Misinterpreting the therapeutic effects of small interfering RNA caused by immune stimulation. *Hum. Gene Ther.* 19, 991–999.
- Swan, C.H., Buhler, B., Tschan, M.P., *et al.* (2006). T-cell protection and enrichment through lentiviral CCR5 intrabody gene delivery. *Gene Ther.* 13, 1480–1492.
- Tebas, P., Stein, D., Tang, W.W., *et al.* (2014). Gene editing of CCR5 in autologous CD4 T cells of persons infected with HIV. *N. Engl. J. Med.* 370, 901–910.
- Walker, J.E., Chen, R.X., McGee, J., *et al.* (2012). Generation of an HIV-1-resistant immune system with CD34⁺: Hematopoietic stem cells transduced with a triple-combination anti-HIV lentiviral vector. *J. Virol.* 86, 5719–5729.
- Yang, A.G., Bai, X., Huang, X.F., *et al.* (1997). Phenotypic knockout of HIV type 1 chemokine coreceptor CCR-5 by intrakines as potential therapeutic approach for HIV-1 infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94, 11567–11572.

Address correspondence to:

Dr. G. Marodon
CIMI
INSERM U1135
CNRS ERL 8255
CERVI
83 Bd de l'Hôpital
F-75013 Paris
France

E-mail: gilles.marodon@upmc.fr

and

Prof. Guy Gorochov
CIMI
INSERM U1135
CERVI
83 Bd de l'Hôpital
F-75013 Paris
France

E-mail: guy.gorochov@upmc.fr

Received for publication April 2, 2014;
accepted after revision July 10, 2014.

Published online: July 21, 2014.

Article 3: La combinaison d'inhibiteur l'entrée du VIH dans un vecteur lentiviral, prévient *in vivo* la délétion des lymphocytes T CD4 (article non soumis).

1 Résumé

Dans cette étude, nous avons développé un modèle de souris humanisées par transfert de lymphocytes T humains, dans lequel nous avons pu évaluer l'efficacité de notre combinaison de transgènes contre le VIH *in vivo*. Dans un premier temps nous avons validé une nouvelle construction lentivirale, dans laquelle nous avons ajouté le gène rapporteur de la GFP pour faciliter la détection des cellules transduites. Basée sur l'expression de la GFP, nous avons démontré que les cellules transduites avaient un fort avantage sélectif *in vivo* dans les animaux infectés par le VIH. De plus, notre cassette thérapeutique prévient également la délétion des lymphocytes T CD4 dans le sang, la rate et la moelle osseuse, bien que nous ne détectons pas d'impact sur la charge virale dans les conditions de l'expérience.

2 Résultats

2.1 Validation du vecteur tricistronique

La cassette thérapeutique portant le peptide C46 et l'intrakine P2 a déjà démontré son efficacité *in vitro* sur une lignée cellulaire et sur des PBMC humains. Les cellules transduites présentent un avantage sélectif dans des conditions infectées, des forts niveaux de transduction inhibent la réplication virale et les transgènes travaillent en synergie contre le virus (Petit et al. 2014). Pour faciliter la détection *in vivo* des cellules transduites, nous avons cherché à valider un nouveau vecteur tricistronique portant les gènes de la GFP, du peptide C46 et de l'intrakine P2 sous le contrôle du promoteur ubiquitaire EF1- α (Lv209). Le vecteur contrôle permet l'expression de la GFP seule sous le contrôle du même promoteur (LvGFP) (Fig.1A). Dans cette expérience, les cellules transduites représentent 34% des cellules totales. Parmi ces 34%, on détecte l'expression du peptide C46 dans 57.6% des cellules (fig 1B). L'expression du peptide C46 n'est pas détectée dans les cellules GFP- (Fig.1B). Il existe donc une corrélation entre l'expression de la GFP et du peptide C46. De plus, on observe également une baisse de la fréquence des lymphocytes T CD4⁺CCR5⁺ dans les cellules GFP⁺ en comparaison des cellules GFP- , représentant respectivement des fréquences de 17.3% et

43.7%, soit une baisse de 60.5% des cellules CD4⁺ CCR5⁺ dans les cellules transduites. L'expression de la GFP est également associée à une baisse de la médiane de fluorescence (MFI) de CCR5. Les cellules GFP⁺ ont une MFI de CCR5 inférieure aux cellules GFP⁻ (246 vs 347) représentant une baisse de 30% (Fig.1C).Caractérisation du modèle NSG-PBL.

De façon à établir un modèle de souris humanisées proche de la réalité clinique d'une thérapie génique par transfert adoptif de lymphocytes T, nous avons dans un premier temps testé plusieurs protocoles de greffe et de conditionnement pré-greffe. Le protocole P1, dans lequel les souris sont irradiées à 2 Gy puis greffées avec 2.10⁶ de lymphocytes T transduits, s'accompagne d'une forte mortalité dans les jours qui suivent la greffe avec une perte d'environ 40% des animaux en moins de 10 jours. Le protocole P2, dans lequel les souris non-irradiées sont greffées avec 2.10⁶ de lymphocytes T transduits, et le protocole P3, dans lequel les souris sont irradiées à 1 Gy puis greffées avec 6.10⁶ de lymphocytes T transduits, s'accompagnent de mortalité moindre et décalée dans le temps par rapport à P1. (Fig.2A). Les cellules humaines sont facilement identifiables dans le sang des souris par cytométrie (Fig. 2B), ce qui nous permet d'évaluer le chimérisme selon les protocoles. Le protocole P3 permet une meilleure greffe de cellules humaines que le protocole P2 en 12 jours(Fig.2C). A des temps plus éloignés, le protocole P2 s'accompagne aussi de fortes fréquences de lymphocytes T CD3⁺ dans le sang mais avec une efficacité moindre que P3 (données non montrées). Pour les animaux du protocole P3 nous n'avons pas observé de perte de poids (symptôme associé à une xéno-GVHD (graft vs host disease)) dans l'ensemble des animaux mais seulement dans les souris devant être sacrifiées pour raisons éthiques (identifiées en rouges) (Fig.2D). Le protocole P3 permet donc un bon chimérisme, tout en préservant au maximum la santé des animaux, ce qui nous donne une bonne fenêtre pour l'étude de la réplication virale.

Migration des lymphocytes T CD4⁺ CCR5⁺ dans les NSG-PBL après greffe de PBMC. Les lymphocytes T CD4 deviennent majoritaires et représentent plus de 90% des cellules présentes dans la souris au sacrifice, entre 34 et 53 jours post greffe. De plus, il n'y a pas de différence significative entre les fréquences des lymphocytes T CD4⁺ dans les populations CD3⁺ GFP⁺ ou GFP⁻ (Fig3.A et B), montrant que la transduction par le vecteur tricistronique Lv209 n'affecte pas la reconstitution en lymphocytes T CD4⁺ majoritaires. L'étude de la répartition des cellules dans les différents tissus/organes nous permet d'évaluer si la baisse d'expression de CCR5 induite par l'intracine P2 présente dans le vecteur Lv209 affecte la

migration des cellules transduites. Les fréquences des lymphocytes T CD4⁺ CCR5⁺ dans les populations CD3⁺ GFP⁺ ou GFP-de la rate ou de la MO ne présentent pas de différence significative (Fig.3C). Bien que non significative (p=0.0519), une nette tendance à la baisse des lymphocytes T CD4⁺CCR5⁺ dans les cellules transduites GFP⁺ est observée dans le sang (Fig 3C).

Comme observé in vitro (fig 1C), l'intrakine P2 permet de réduire significativement le nombre de molécules de CCR5 à la surface des cellules transduites dans le sang et la rate, se traduisant par une baisse de la MFI de CCR5 dans les cellules GFP⁺. Cependant, il n'y a pas de différence significative pour la moelle osseuse probablement due à un nombre d'échantillon trop faible (Fig.3D). Ce résultat suggère que l'expression de l'intrakine P2 pourrait affecter l'expression de CCR5 dans tous les tissus.

2.2 Avantage sélectif des cellules transduites et charge virale

Pour évaluer la protection conférée par notre vecteur thérapeutique, nous avons suivi la fréquence de cellules CD4⁺ GFP⁺ transduites avec le vecteur Lv209 ou avec le vecteur LvGFP dans les animaux infectés par le VIH. De façon à normaliser le nombre de cellules transduites injectées selon les vecteurs, la fréquence des cellules GFP⁺ a été ramenée à 10% en les mélangeant avec des cellules non-transduites, avant la greffe. Dans ces souris infectées avec une souche à tropisme R5 (NL4D8), la fréquence dans le sang de la population CD4⁺GFP⁺ augmente progressivement au cours du temps et représente à la fin de l'expérience environ 90% des lymphocytes T CD4 dans les souris du groupe Lv 209. En revanche, Il n'y a pas d'augmentation significative de la proportion des cellules GFP⁺ dans le groupe contrôle qui reste à moins de 20% (Fig.4A et B). Ce résultat est confirmé dans la rate et la moelle osseuse puisqu'à la fin de l'expérience, les fréquences des cellules GFP⁺ représentent environ 80% des lymphocytes T CD4 alors que dans le groupe Lv GFP, les fréquences de ces populations restent stables autour de 10% (Fig.4C). Ces résultats démontrent que le vecteur Lv209 confère un avantage sélectif aux lymphocytes T CD4. Pour déterminer que cet avantage sélectif est bien dû à une protection contre le VIH et non à une augmentation de la prolifération induite par le vecteur, nous avons comparé la proportion de lymphocytes T transduits par le vecteur Lv209 en présence ou en absence du VIH. On observe une augmentation de la fréquence des lymphocytes T GFP⁺ seulement en présence du virus (Fig.4D), démontrant que l'expression des transgènes du vecteur Lv209 n'induit pas une prolifération accrue des cellules transduites mais bien une protection contre l'infection..

Malgré le fort avantage sélectif observé les souris présentent des charges virales plasmatiques similaires qu'elles soient greffées avec les cellules transduites par le vecteur Lv GFP ou par le vecteur Lv 209 (Fig4.E). Ce vecteur confère donc aux cellules transduites un avantage sélectif mais notre stratégie ne permet pas le contrôle de la charge virale dans les conditions de l'expérience.

2.3 Protection contre la délétion des lymphocytes T CD4⁺ transduits

Pour mesurer la capacité de notre vecteur à induire une protection des lymphocytes T CD4 *in vivo*, nous avons évalué la fréquence de lymphocytes T CD4⁺ dans les populations CD3⁺ GFP⁺ ou CD3⁺ GFP⁻. Au sein des souris greffées avec des lymphocytes T transduits (Lv209) et infectée par le VIH (NL4D8), on observe que la fréquence des lymphocytes T CD4 dans les populations transduites évolue peu dans le sang et reste supérieure à 80% après 30 jours d'infection, alors que la fréquence des lymphocytes T CD4⁺ dans la population GFP⁻ s'effondre à moins de 10% (Fig.5A). Dans les souris infectées et greffées avec des lymphocytes T transduits par le vecteur contrôle Lv GFP, on observe une délétion aussi bien dans les populations CD3⁺ GFP⁺ que CD3⁺ GFP⁻ (Fig.5B). A la fin de l'expérience, on retrouve plus de 80% de lymphocytes T CD4⁺ dans les populations transduites par le Lv 209 (GFP⁺) alors qu'ils s'effondrent aux alentours de 20% dans les populations non protégées (GFP⁻) et ce dans la rate et la moelle osseuse, (Fig.5C). Dans le groupe contrôle Lv GFP, il n'y a pas de différence significative dans la proportion des lymphocytes T CD4⁺ dans les lymphocytes CD3⁺ entre les populations GFP⁺ et GFP⁻ et on observe la même baisse dans la rate et la moelle osseuse, (Fig.5D). Ces résultats démontrent que les gènes thérapeutiques protègent les lymphocytes T CD4 de la délétion induite par le VIH.

Pour déterminer que le vecteur Lv209 prévient la délétion des lymphocytes CD4⁺ CCR5⁺ dans ce modèle, nous avons évalué la proportion de ces cellules dans des souris ayant reçu des cellules transduites par le vecteurLv209 et infectées par le VIH. La fréquence des cellules CD4⁺ CCR5⁺ dans les populations CD3⁺ GFP⁻ est inférieure à celle des cellules CD3⁺ GFP⁺ dans le sang (79% vs 55%), dans la rate (64% vs 24%) et dans la moelle osseuse (80% vs 44%) (Fig.5E). De plus, les cellules CD4⁺ CCR5⁺ des populations CD3⁺ GFP⁺ ont des MFI significativement supérieures aux cellules CD3⁺ GFP⁻ de la rate et de la moelle osseuse (Fig.5F). En conclusion, ces résultats montrent que les lymphocytes T CD4⁺ exprimant de faibles niveaux de CCR5 suite à l'expression de l'intracrine (fig 3D) ont un avantage sélectif par rapport à des cellules non protégées. Notre combinaison thérapeutique protège donc de la

délétion induite par le VIH les cellules naturellement très sensibles à l'infection, les lymphocytes T CD4⁺ CCR5⁺. .

3 Discussion

Dans un précédent article, nous avons apporté la preuve que la cassette thérapeutique combinant le peptide C46 et l'intrakine P2 conférait une protection aux lymphocytes T transduits *in vitro* (Petit et al. 2014). Dans cette nouvelle étude, réalisée dans un modèle de souris humanisées par transfert adoptif de lymphocytes T transduits, nous confirmons son potentiel thérapeutique *in vivo*, en démontrant un avantage sélectif (Fig.4B et C) et une protection contre la délétion par le VIH (Fig.5A, C et E). De nombreuses autres approches thérapeutiques utilisant le peptide C46 ont également démontré une bonne efficacité de ce transgène dans les modèles de souris humanisées ainsi que chez le singe (Kimpel et al., 2010); (Younan et al. 2013); (H.-P. Kiem et al., 2010). De plus, les stratégies ciblant l'expression du corécepteur CCR5, ont elles aussi fait la preuve de leur efficacité contre le VIH (Allers et al., 2011),(Hofer et al., 2013), (Walker et al., 2012) et confirme que CCR5 est aujourd'hui une cible indispensable pour la thérapie génique contre le VIH. De façon surprenante, une seule autre stratégie ciblant l'entrée du virus en combinant le peptide C46 et un shRNA CCR5 montre également une diminution de la réplication virale du SHIV sur des lignées *in vitro* (Kiem et al. 2010). Nous pensons que cibler l'entrée du virus est primordiale et que ce type de stratégie, se plaçant en amont de la rétrotranscription, diminue les risques d'émergence de mutants résistants.

Le corécepteur CCR5 joue un rôle important dans l'inflammation et la migration des cellules dans les tissus (Baggiolini et al. 1998). C'est pourquoi, nous avons opté pour une stratégie « douce » permettant une modulation de l'expression plutôt que l'induction d'un KO génétique via des ZFN. De plus, ces technologies ciblant le gène du CCR5 induisent des coupures non spécifiques dans l'ADN entraînant des altérations génétiques non maîtrisables nécessitant plus d'études concernant la sécurité de ce type d'approches (Pattanayak, Ramirez, Joung, & Liu, 2011). Dans notre modèle, on a pu démontrer que la transduction n'influe pas sur la reconstitution/ migration des cellules dans la rate et la moelle osseuse. On note cependant une diminution des cellules CD4⁺CCR5⁺ dans le sang, (Fig.3C). Ces cellules expriment de plus faibles niveaux de CCR5 suite à la transduction (Fig.3D) Ce résultat suggère donc que des cellules exprimant de faibles niveaux de CCR5 pourraient être retenues ailleurs. Les stratégies ciblant CCR5 devront inclure ces possibles modifications dans

l'interprétation des résultats. Finalement, notre stratégie protège les lymphocytes T CD4 et plus spécialement ceux exprimant le CCR5, cibles privilégiées du VIH, tout en permettant l'expression résiduelle du corécepteur CCR5 à la surface des cellules (Fig.5E et F).

Bien que notre vecteur thérapeutique confère une protection contre les effets cytopathiques du virus et qu'on observe un avantage sélectif des cellules transduites, il n'y a aucun effet sur la charge virale (Fig.4B, C et E). Dans les différentes études de thérapies géniques réalisées dans des modèles de souris greffées par des lymphocytes T, seulement deux montrent une baisse de la charge virale dans les souris (Vets et al. 2012), (Perez et al., 2008). Nous pensons que ce modèle est assez peu favorable pour juger de l'impact de notre stratégie sur la charge virale. Une grande majorité des cellules sont fortement activées *in vitro* avec de l'IL-2 et des billes CD3/CD28 avant la greffe et *in vivo* à cause de la réaction du greffon contre l'hôte. Ce type d'activation induit une augmentation de l'expression des corécepteurs à la surface des cellules, les rendant plus sensibles à l'infection par le VIH (Bleul et al., 1997). Des doses plus faibles de virus ou des conditions expérimentales différentes devront être évaluées avant de conclure sur la capacité de notre stratégie à influencer la charge virale.

4 Légende des figures

Figure 1 : Validation du vecteur tricistronique **A)** Représentation schématique des vecteurs lentiviraux SIN utilisés pour l'étude, Lv 209 : co-expression de la GFP, du peptide C46 et de l'intrakine P2 sous contrôle du promoteur EF1- α , LvGFP; vecteur contrôle exprimant la GFP sous contrôle du même promoteur. Δ U3 : délétion du gène U3 dans le LTR. cPPT : central PolyPurine Tract. **B)** Représentation FACS de la co-expression des transgènes codant pour la GFP et le peptide C46 (détecté par l'anticorps 2F5), 29 jours post transduction. **C)** Représentation FACS, de l'expression de la GFP et du corécepteur CCR5 21 jours post transduction. Non transduits (NT), fluorescence moins une (FMO).

Figure 2 : Développement du modèle NSG-PBL. **A)** Survie des souris NSG suite au transfert de PBMC humain selon différents protocoles. Dans le protocole 1 (P1), les souris irradiées à 2 Gy sont greffées avec 2.10^6 de lymphocytes T transduits. Dans le protocole 2 (P2), les souris non-irradiées sont greffées avec 2.10^6 de lymphocytes T transduits. Dans le protocole P3, les souris irradiées à 1Gy sont greffées avec 6.10^6 de lymphocytes T transduits. **B)** Représentation FACS des cellules humaines CD3⁺ dans le sang. **C)** Fréquence des cellules CD3⁺ dans le sang pour les protocoles P2 et P3 entre 12 et 14 jours post greffe. Pool de 3 expériences indépendantes pour P2 et de 2 expériences indépendantes pour P3. **D)** Pourcentage de la masse par rapport à la masse de J0. Le trait pointillé représente 100% de la masse initiale. Les ronds rouges représentent les souris qui ont été sacrifiées pour raisons éthiques.

Figure 3 : Migration des lymphocytes T CD4⁺ CCR5⁺ dans les NSG-PBL. **A)** Représentation FACS de la stratégie de fenestration des populations CD4⁺ dans les populations CD3⁺ GFP⁺ ou CD3⁺ GFP⁻, dans la rate 34 jours post greffe. **B)** Analyse de la fréquence des lymphocytes CD4⁺ dans les populations CD3⁺ GFP⁺ ou CD3⁺ GFP⁻ dans le sang, la rate et la moelle osseuse. Fréquence des lymphocytes T CD4⁺ CCR5⁺ (**C)**) et MFI du CCR5 dans les CD4⁺ (**D)**) dans les populations CD3⁺GFP⁺ ou CD3⁺ GFP⁻, pour la condition Lv 209, dans le sang, la rate et la moelle osseuse. Les résultats montrés sont le cumul de 2 expériences indépendantes ou les animaux ont été sacrifiés entre 34 et 53 jours post greffe.

Figure 4 : Avantage sélectif des cellules transduites et charge virale. **A)** Représentation FACS des cellules GFP⁺ au sein des lymphocytes T CD4⁺ pour les conditions transduites

avec le Lv 209 et le Lv GFP, 35 jours post infection. **B)** Evolution de la fréquence des cellules CD4⁺ GFP⁺ dans le sang au cours de l'infection pour les conditions Lv 209 et Lv GFP. **C)** fréquence des cellules CD4⁺ GFP⁺ au sacrifice dans la rate et la moelle osseuse entre 35 et 63 jours post greffe. Les Panels B et C représentent les résultats cumulés de trois expériences indépendantes. **D)** Evolution de la fréquence des CD4⁺ GFP⁺ dans le sang pour la condition Lv 209 infectée (HIV⁺) ou non. (HIV⁻) **E)** Charge virale plasmatique en nombre de copie d'ARN/ml pour les conditions Lv 209 et Lv GFP. Les panels D et E sont chacun le cumul de 2 expériences indépendantes totalisant respectivement 13 et 10 souris.

Figure 5 : Protection contre la délétion des lymphocytes T CD4⁺ transduits. Evolution de la fréquence des lymphocytes T CD4⁺ dans les populations CD3⁺ GFP⁺ et CD3⁺ GFP⁻ pour les conditions Lv 209 (**A**) et Lv GFP (**B**) infectées. Fréquence des lymphocytes T CD4⁺ au sein des CD3⁺ GFP⁺ ou des CD3⁺ GFP⁻ dans la rate et la moelle pour les conditions Lv 209 (**C**) et Lv GFP (**D**). Fréquence des lymphocytes T CD4⁺ CCR5⁺ (**E**) et MFI du CCR5 dans les CD4⁺ (**F**) dans les populations CD3⁺GFP⁺ ou CD3⁺ GFP⁻, pour la condition Lv 209, dans le sang, la rate et la moelle osseuse entre J23 et J57 post infection. Les panels E et F sont chacun un pool de 4 expériences indépendantes. Analyses réalisées au sacrifice entre J23 et J57 post infection, cumul de 3 à 5 expériences indépendantes.

5 Figures

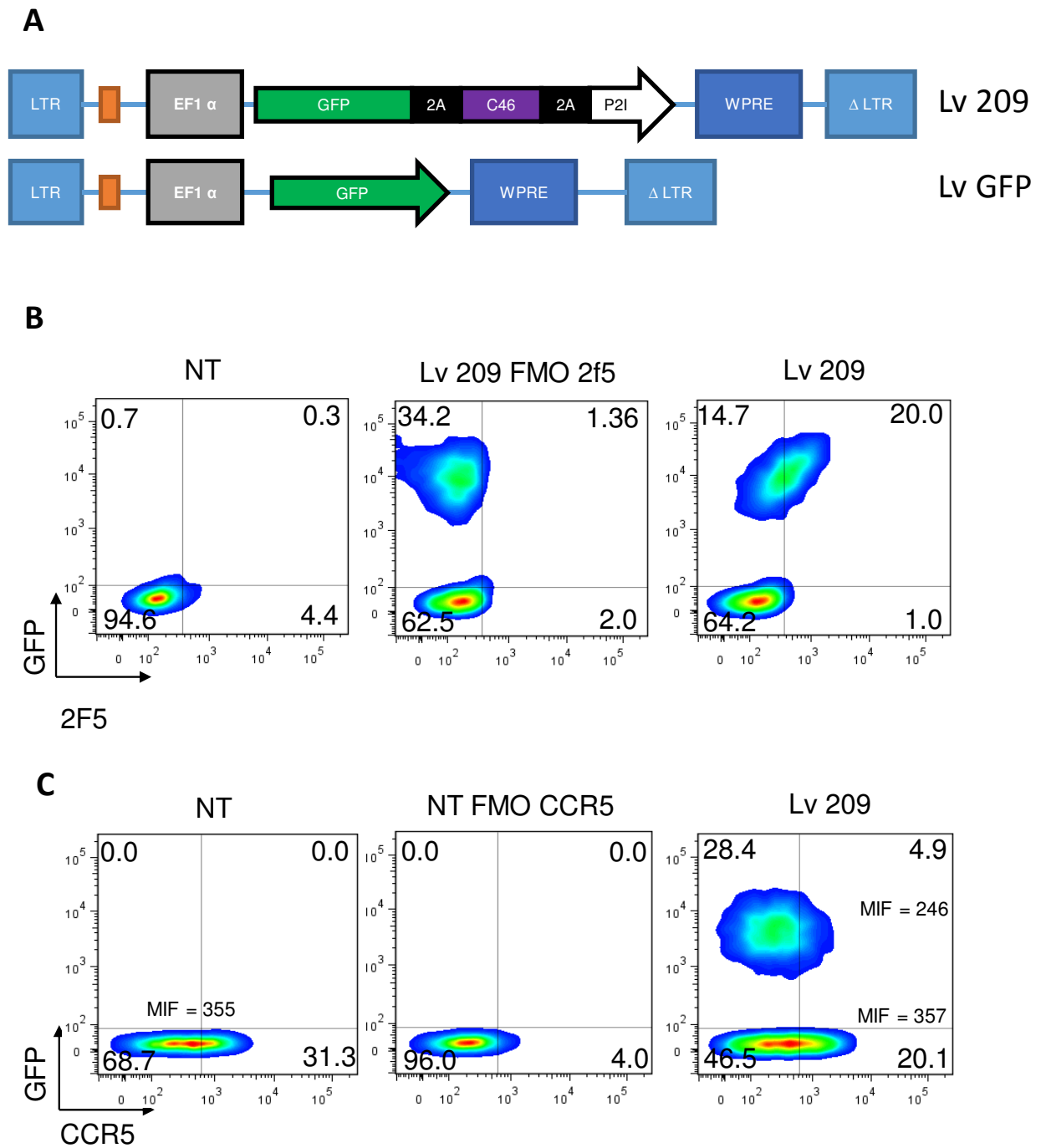


Fig.1

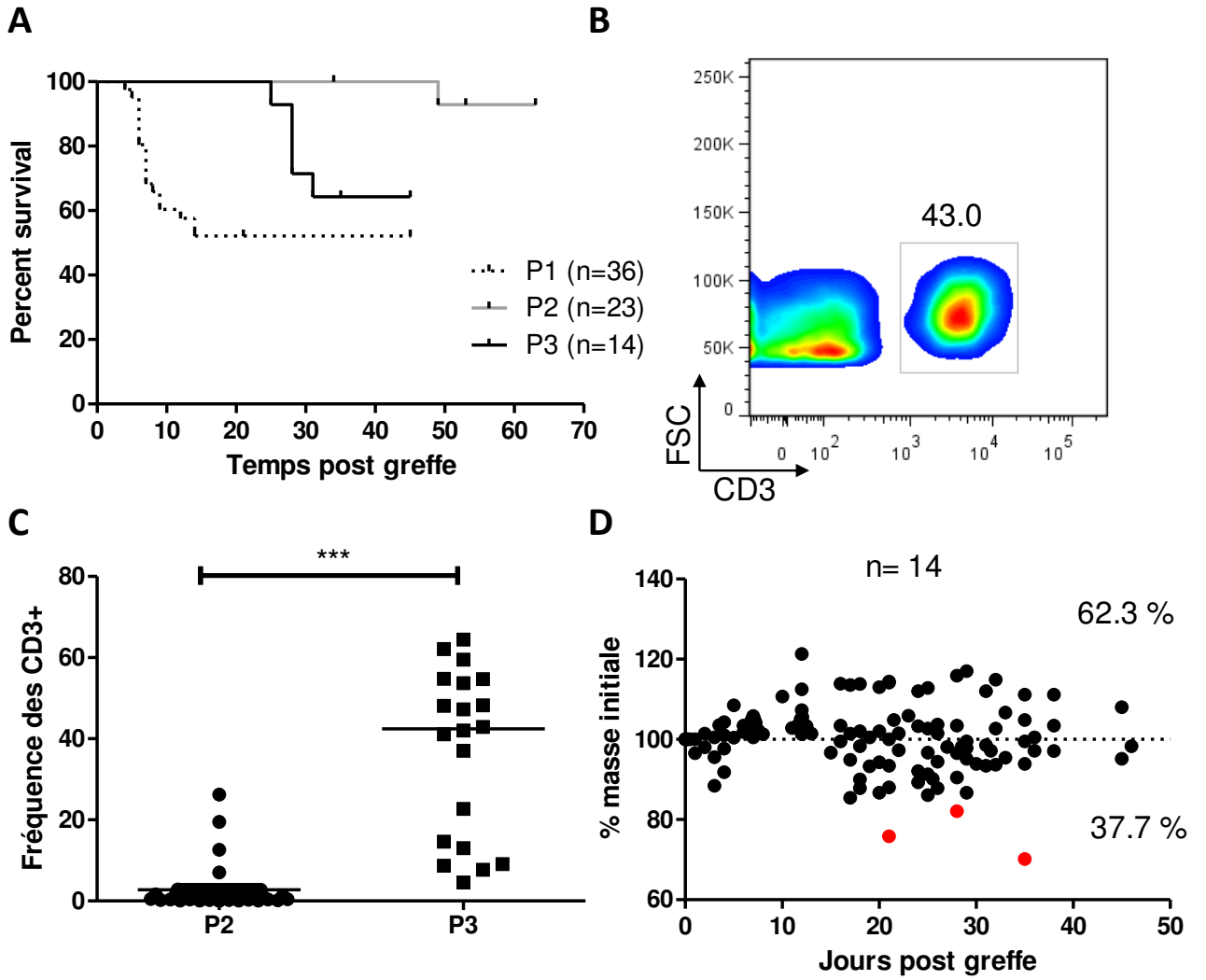


Fig.2

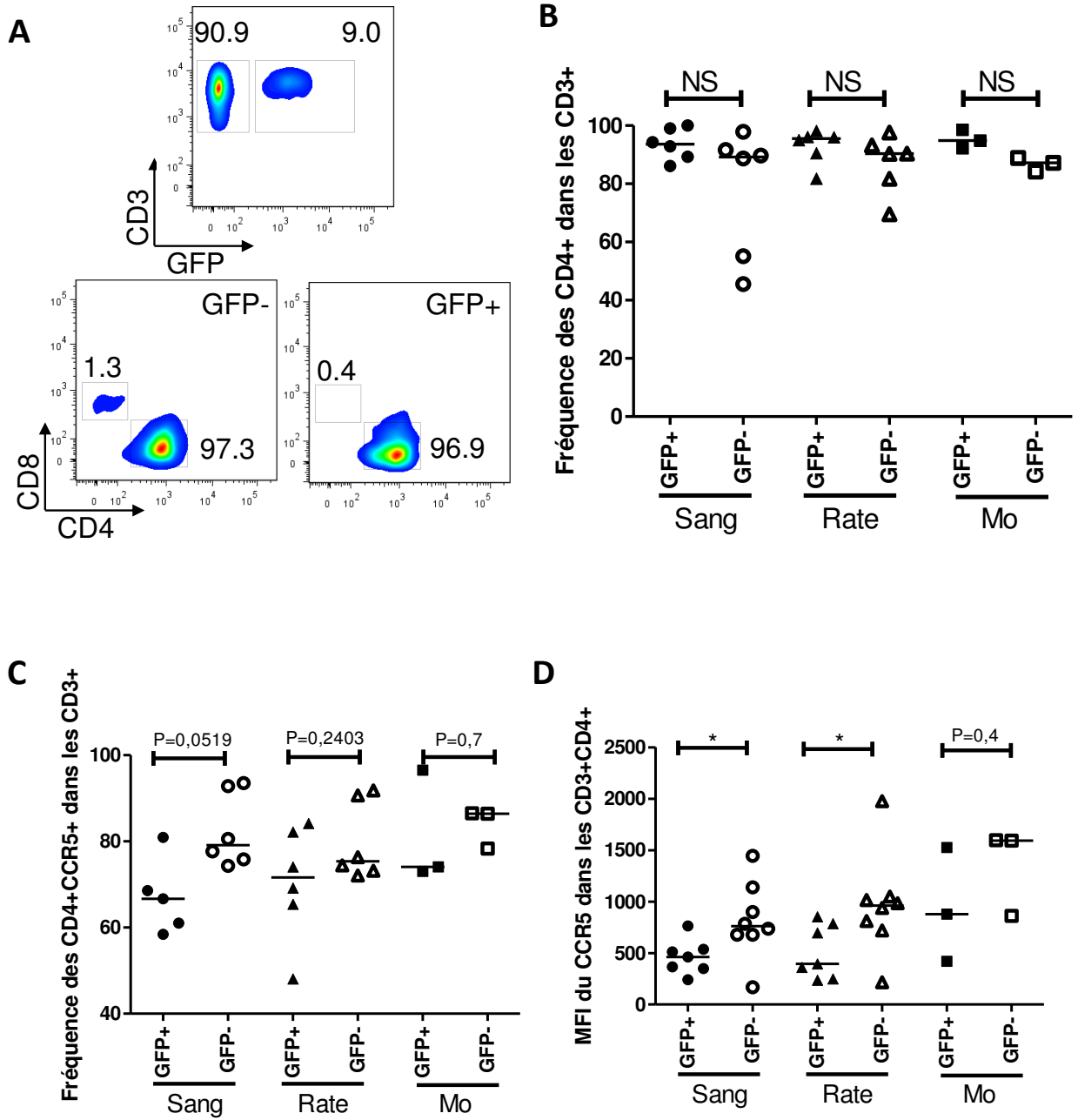


Fig.3

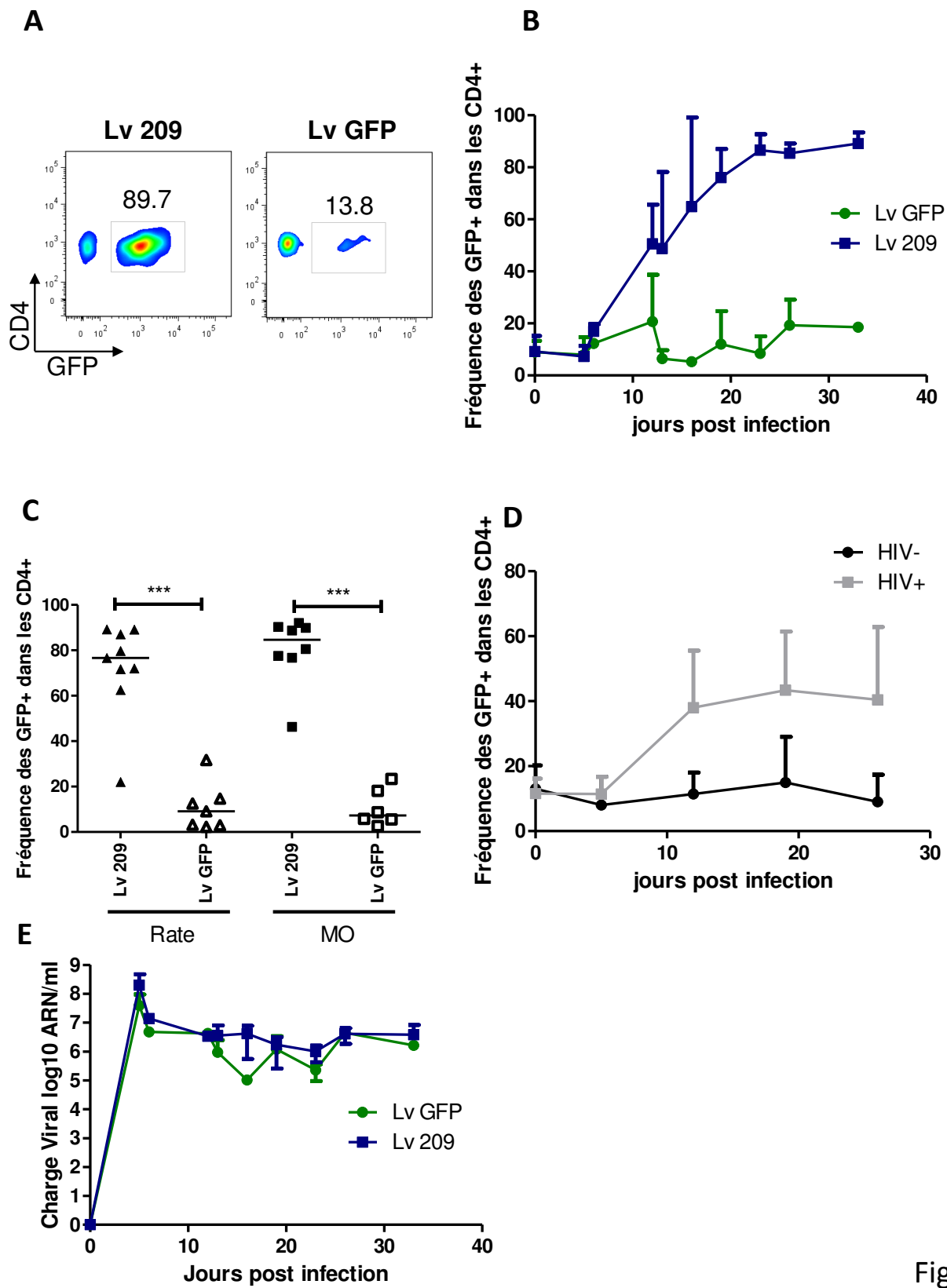


Fig.4

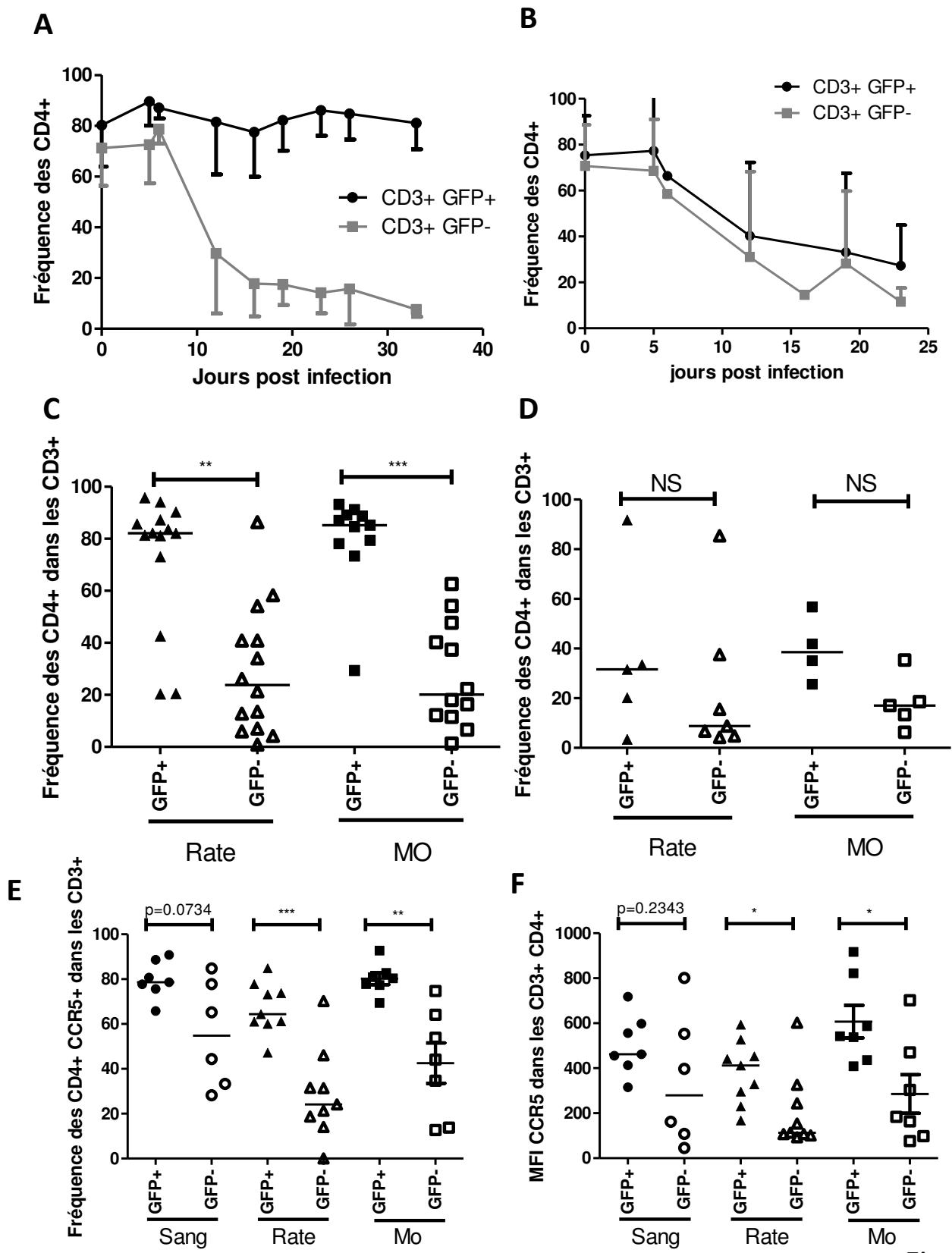


Fig.5

6 Matériels et Méthodes

6.1 Culture des cellules primaires humaines

Les cellules primaires humaines sont issues d'échantillons de leucophrèse collectée à partir d'individus sains après avoir donné leur consentement éclairé. Les cellules sont purifiées par gradient de densité puis elles sont mises en cultures et activées à une concentration à 1.10^6 cellules /ml dans du RPMI complétement avec du sérum de veau foetal ou du sérum humain AB, des antibiotiques, de l'interleukine-2 (60 ou 600 UI/ml) (Proleukin®, Novartis) et des billes CD3/CD28 (Dynabeads® CD3/CD28 CTS, Invitrogen) à raison de trois billes par cellule.

6.2 Production des vecteurs lentiviraux

Dans cette étude nous utilisons des lentivirus de seconde génération. La séquence 2A est issue du virus de la fièvre aphteuse. La séquence WPRE (Woodchuck Hepatitis virus regulatory element) est issue du virus hépatique de la marmotte. Les vecteurs sont produits sur la lignée cellulaire trans-complémentante HEK-293T. 15.10^6 cellules HEK-293T, en culture dans une flasque 175, sont transfectées avec 23,3 µg du plasmide packaging Δ8.9, 10 µg du plasmide d'enveloppe VSV-G et 30 µg du plasmide d'intérêt co-précipités au phosphate de calcium. Les vecteurs viraux, présent dans le surnageant, sont concentrés 48 heures post-transfection par ultrafiltration (Centricon Plus-70, Millipore, Molsheim, France) à 3500 G à 4°C. Les stocks de vecteurs viraux sont conservés à -80°C. Le titre viral est déterminé sur 10^5 cellules HEK-293T en présence de polybrène (8µg/ml) (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France), par dilution successive des surnageants concentrés. Soixante-douze heures post transduction, la fréquence de cellules exprimant les transgènes est mesurée par cytométrie de flux et permet de déterminer le nombre de particules infectieuses/ml présent dans le surnageant.

6.3 Souche virale du VIH

Le clone moléculaire du VIH-1, NL4D8 a été obtenu du Dr A Moris (CIMI, Paris) donné. La production du VIH est réalisée par transfection de 15.10^6 cellules HEK-293T dans une flasque 175, du plasmide portant le génome complet du virus NL4D8. Le surnageant est

récolté 48 heures post transfection et directement congelé. La concentration virale est déterminée par dosage ELISA de la p24 (Retrotek, ZeptoMetrix, Buffalo, NY, USA) dans le surnageant.

6.4 Transduction des cellules humaines

Les cellules sont transduites trois jours post activation CD3/CD28⁺IL-2 avec soit le lentivirus thérapeutique (Lv209), soit le lentivirus contrôle (LvGFP) à des MOI (Multiplicity of infection) de 10 ou de 20. Les cellules sont transduites en présence de protamine sulfate (2µg/ml) par centrifugation à 1500 G pendant 2H à 30°C et mises en culture 18H à 37°C avant que les lentivirus soient éliminés par lavages. Le niveau d'expression des transgènes est évalué trois jours post transduction par cytométrie de flux avant que les cellules ne soient greffées dans les souris à un ratio de 20% avec les cellules non-transduites

6.5 Génération des souris humanisées et infection par le VIH.

Les souris NSG (NOD Prkdc^{scid} Il2rg^{tm1Wjl}) ont été initialement achetées au Jackson Laboratory et la colonie a été maintenue en stabulation dans le Centre d'Expérimentation Fonctionnelle (CEF) de la Pitié Salpêtrière. Les animaux sont irradiés par rayonnement X puis les cellules sont greffées par la voie rétro-orbitale. Les doses d'irradiations et le nombre de cellules injectées sont décrits dans la légende des figures. Chaque souris est infectée avec 25 ng de p24 par la voie rétro-orbitale, dès qu'elle présente une fréquence de lymphocyte T humain supérieure à 1% dans le sang.

6.6 Suivi des cellules humaines

La fréquence des cellules humaines est suivie dans le sang par cytométrie de flux. Les globules rouges sont lysés par ajout d'eau stérile pendant 15 secondes avant l'ajout de PBS 10X. Les cellules sont lavées puis marquées avec les anticorps CD3 PeCy7 ; CD4 PerCp ; CD8 Alexa 700 ; CCR5 Efluor647 (Biolegend) pendant 15 min à l'obscurité dans du PSB 1X. Après le marquage, les cellules sont lavées et fixées pendant 45 min dans une solution de formaldéhyde (FA) à 1% pour inactiver le virus. La détection du peptide C46 est réalisée avec l'anticorps 2F5, lui-même révélé par un anticorps de chèvre anti-IgG humain couplé au PE. L'acquisition des cellules est réalisée sur le cytomètre de flux LSRII (BD Biosciences) et l'analyse est faite sur le logiciel FlowJo (Tree Star, San Carlos, CA).

6.7 Mesure de la charge virale plasmatique

Pour la mesure de la charge virale le sang est prélevé sur l'anticoagulant ACD (Acid-Citrate-Dextrose) puis centrifugé 5 min à 400G. La mesure de la charge virale est ensuite réalisée sur le plasma dans le service de virologie de l'hôpital Tenon. La technique employée est la qRT-PCR en temps réel d'Abbott qui permet la détection des ARN viraux en ciblant une région conservée de l'intégrase. Le seuil de sensibilité de cette technique dépend directement du volume de plasma.

6.8 Analyse statistique

L'ensemble des analyses statistiques ont été réalisées avec le test Mann Whitney qui permet la comparaison des médianes entre deux groupes non appariés (Logiciel Prism 5.0).

Discussion et perspectives

L'initiation en 2014 d'un essai clinique par une entreprise privée nord-américaine et exploitant une approche très similaire à la nôtre en termes de gènes thérapeutiques (<http://www.calimmune.com/home.php>), prouve l'intérêt de tester cette combinaison de transgènes chez l'Homme.

Etat de l'art

Ces dernières années de nombreuses études proposant des stratégies de thérapies géniques dirigées contre le VIH ont été publiées, traduisant un réel intérêt de la communauté scientifique pour cette approche. En effet, depuis 2003, on compte 30 publications démontrant l'efficacité de leur stratégie dans des modèles précliniques (souris humanisées et singes). Parmi l'ensemble de ces publications, près des 2/3 (18/28) possèdent au moins un gène ciblant l'entrée du virus (Cf Tableau 3). Pendant ma thèse, j'ai évalué l'efficacité de notre stratégie d'inhibition d'entrée, combinant deux transgènes : le peptide C46 et l'intrakine P2, dans un modèle de souris humanisées. Bien qu'au sein de l'équipe nous ayons une bonne expertise des souris humanisées par greffe de CSH (souris-Hu)(Marodon et al., 2009; Pham et al., 2012) (Article 1), nous avons testé notre approche dans le modèle de souris humanisées par transfert de lymphocytes T (souris-PBL). Comme nous l'avons vu dans l'introduction, ce modèle présente l'avantage d'être plus simple à mettre en œuvre que des souris-Hu. De plus, il est susceptible à l'infection par le VIH et présente une forte déléation des lymphocytes T CD4 post infection. Un protocole de greffe bien équilibré entre l'irradiation et le nombre de cellules transférées confère au modèle une fenêtre d'étude supérieure à 1 mois (Article 3). Treize études sur trente ont également choisi ce modèle et parmi ces treize, dix y ont testé une approche ciblant l'entrée.

Au vu de ces données, on peut en conclure que ce modèle semble être un très bon outil pour tester des stratégies ciblant l'entrée du virus et que ces dernières présentent un réel intérêt pour une approche thérapeutique.

Stratégies de thérapies géniques ciblant l'entrée dans le modèle des souris humanisées

L'objectif premier de la thérapie génique contre le VIH n'est pas l'éradication du virus dans le patient mais de lui permettre de contrôler son infection sans ARV. Dans le cadre des approches ciblant l'entrée du virus, certains critères sont indispensables pour valider l'efficacité de la stratégie, comme l'avantage sélectif, la protection contre la délétion induite par le VIH et la diminution de la charge virale sans traitement. Mon travail de thèse représente un des rares exemples d'études examinant simultanément ces 3 paramètres *in vivo*.

1 Avantage sélectif des cellules modifiées

Depuis la découverte du rôle de CCR5 comme corécepteur majeur de l'infection des lymphocytes T CD4, de nombreux travaux ont ciblé CCR5 pour prévenir l'infection. Le patient de Berlin n'a fait que renouveler et étendre la portée de ces stratégies. Les études les plus récentes utilisent des ZFN pour altérer l'expression du co-récepteur CCR5. Dans une de ces études, les auteurs montrent que les cellules transduites ont un avantage sélectif *in vitro* et *in vivo* respectivement d'un facteur 2 et 3 environ (Perez et al., 2008). Dans une seconde étude utilisant une approche combinée ZFN CCR5 et ZFN CXCR4, les résultats montrent une augmentation des cellules transduites identique à la précédente étude après infection par le VIH (Didigu et al. 2014). Nos résultats avec les cellules humaines *in vitro* concordent avec ceux trouvés dans ces deux études, avec un enrichissement de deux fois pour les cellules transduites (Article 2). Il sera difficile d'observer un enrichissement supérieur suite à la courte durée de vie des cellules infectées *in vitro* et à la toxicité bystander engendrée par la mort cellulaire. En revanche, l'avantage sélectif que nous observons *in vivo* est plus marqué, puisqu'on peut noter un enrichissement en cellules protégées de près d'un facteur 10 (Article 3). Ce chiffre est difficile à comparer avec les études utilisant les ZFN puisque le suivi des cellules transduites dans ces stratégies est compliqué par l'absence de gène rapporteur pour tracer et quantifier les cellules transduites. Le suivi se fait soit sur la fréquence d'expression du CCR5 par cytométrie soit sur le pourcentage de CCR5 mutés par séquençage. Or l'approche par cytométrie de flux ne permet pas d'évaluer précisément l'enrichissement des

cellules transduites car nous avons démontré que les lymphocytes T CD4⁺ exprimant un fort niveau de CCR5 sont préférentiellement délétés (Article 3).

Dans une étude utilisant un ZFN, un avantage sélectif marqué est rapporté 4 semaines après infection puisque la fréquence des cellules transduites explose soudainement de 5 à 80% en deux semaines (Holt et al. 2010). Ce résultat est très surprenant car nous notons une augmentation progressive corrélée à la charge virale dans notre étude. La différence de modèle (souris Hu vs souris PBL) pourrait expliquer ce résultat discordant. Notons toutefois que des résultats de cette équipe montrés à la conférence de Séoul sur les souris humanisées ne reproduisent pas l'observation de l'avantage sélectif si les souris-Hu sont reconstituées à partir de CSH de foie fœtal et non de sang de cordon. Clairement, plus d'études seront nécessaires pour valider la supériorité des ZFN et de la délétion de CCR5, comparées à des approches de transfert de gènes visant à conférer la protection contre l'entrée du virus en combinant plusieurs inhibiteurs. Une autre étude cible également l'entrée du virus avec une combinaison d'un peptide C46 et d'un shRNA CCR5. Les résultats montrent un avantage sélectif *in vitro* sur une lignée cellulaire, avec 65% des cellules qui expriment le transgène, après 3 semaines de culture (augmentation de 3,5 fois)(résumé 702 (ASGCT, 2014)). Ces données sont en accord avec les chiffres de notre étude *in vitro*. En revanche, Kimpel et al. montrent un avantage sélectif massif des lymphocytes T *in vitro* exprimant seulement le peptide C46 *in vitro* avec à la fin de l'expérience près de 100% de cellules protégées. Ces résultats sont contradictoires avec nos données et celles des précédentes études. De façon surprenante, l'avantage sélectif *in vivo* observé dans cette étude est plus modéré que le nôtre car le pic de cellules transduites est atteint avec 60% de cellules protégées alors que nous retrouvons près de 80% des cellules protégées (Kimpel et al. 2010)(Article 3). De plus, dans leur étude, on observe une baisse de la fréquence des cellules transduites après J20, traduisant soit un problème d'expression des transgènes dû à l'utilisation du promoteur SFFV, soit la disparition des cellules transduites par apoptose. Cette diminution précède l'euthanasie des animaux, éthiquement nécessaire après J40 dans leurs conditions de greffe de PBMC. Nos résultats montrent une stabilité de la fréquence des cellules transduites avec un vecteur lentiviral et un promoteur EF1 α jusqu'à l'euthanasie des animaux, suggérant que la protection conférée par notre vecteur bicistronique pourrait être supérieure à celle conférée par un vecteur monocistronique exprimant uniquement C46. Il aurait été informatif de savoir si l'expression de leur transgène est stable *in vivo* dans une condition non infectée.

Il a récemment été démontré que la pyroptose était le principal mécanisme de mort cellulaire des lymphocytes T CD4 chez les patients infectés par le VIH. Cette dernière est induite par l'activation de la caspase 1 lors d'infections abortives (Doitsh et al., 2014). Les stratégies d'inhibition d'entrée permettent également de prévenir ce mécanisme, ce qui devrait favoriser l'avantage sélectif des cellules protégées dans les sites de fortes productions virales comme les GALT chez l'Homme (Brenchley et al., 2004). Nos résultats soutiennent cette hypothèse puisque dans le modèle de souris NSG-PBL les cellules transduites sont protégées contre la délétion. De plus, nous observons également un avantage sélectif de ces dernières dans le sang, la rate et la moelle osseuse, suggérant que cela pourrait aussi être le cas dans les GALT. Dans nos modèles de souris humanisées (NSG-Hu et NSG-PBL) on observe très peu de cellules humaines dans l'intestin (données non montrées). De plus, ces souris n'ont pas de ganglions lymphatiques sauf exceptionnellement certaines NSG-Hu. Ces modèles ne permettent donc pas de mimer les atteintes au niveau des GALT.

Pour résumer, notre stratégie confère un avantage sélectif *in vitro* comparable à ceux trouvés dans la littérature et ce indépendamment de la stratégie utilisée. Concernant les données *in vivo*, bien qu'il soit difficile de comparer avec les stratégies utilisant les ZFN, notre approche semble conférer un meilleur avantage sélectif que ceux montrés dans les autres études avec ce modèle de souris humanisées.

2 Protection contre la délétion des CD4⁺

Un autre paramètre qu'il est primordial de suivre pour juger de l'efficacité d'une stratégie de thérapie génique VIH est la protection des lymphocytes T CD4 contre la délétion induite par le virus. Dans des conditions infectées par le VIH, nous montrons qu'au sein des lymphocytes T CD3 transduits, la fréquence des cellules CD4⁺ reste stable et supérieure à 80% alors que la fréquence des cellules non protégées décline très vite, démontrant ainsi un effet protecteur sur ces cellules (Article 3). Au vu de la variabilité de la reconstitution que présente ce modèle, entre nos mains et pour d'autres (Article 3)(An et al., 2008), il nous a été impossible d'évaluer la protection en termes de nombre absolu de lymphocytes T CD4 dans le sang et en périphérie. En effet, il existe de grandes différences dans le nombre de cellules retrouvées dans la rate entre les animaux (données non montrées), empêchant toute conclusion. En revanche, l'étude de Kimpel a pu montrer une baisse du nombre de lymphocytes T CD4 moins prononcée dans les conditions protégées (Kimpel et al., 2010).

Un autre résultat très surprenant dans l'étude de Holt est la délétion massive des lymphocytes T CD4 dans le sang 6 semaines après infection. Pour plus de la moitié des souris, les auteurs observent une fréquence des lymphocytes T CD4 proche de 0. Dans notre étude portant sur les souris humanisées par greffe de CSH, nous n'avons jamais observé de délétion des lymphocytes T CD4 aussi prononcée. En effet, la fréquence de lymphocytes T CD4 passe de 60% avant infection à 40%, 4 semaines post infection. De plus, seulement 1 souris présente une fréquence de lymphocytes T CD4 proche de 0 mais après plus de 160 jours d'infection (Article 1). Cependant, il est intéressant de noter l'efficacité des ZFN CCR5 contre la délétion des lymphocytes T CD4, totalement abolie dans le sang (Holt et al., 2010). Une autre étude réalisée dans les souris-Hu, utilisant un vecteur tri-cistronique (shRNA CCR5, leurre de Tar et TRIM5 α) montre également que la délétion des lymphocytes T CD4 dans le sang après 15 semaines d'infection est plus modérée que dans l'étude de Holt, que les souris soient infectées par du VIH R5 ou X4 et que la stratégie protège également complètement les souris de la délétion. En revanche dans cette étude, il est difficile de savoir quel transgène a protégé les lymphocytes T CD4 de la délétion. Au vu de nos résultats et de ceux obtenus avec les ZFN, il est tentant de proposer que les inhibiteurs de CCR5 sont suffisants pour protéger les lymphocytes T CD4 de la délétion.

Une jolie étude montre la production d'Ac neutralisant vectorisés dans un AAV, suite à l'injection du vecteur en intramusculaire dans des souris PBL. Cette stratégie prévient complètement la délétion des lymphocytes T CD4 avec l'Ac neutralisant B12, les autres Ac testés ayant montré une efficacité moindre (Balazs et al. 2011). L'immense avantage de ce genre de stratégie est qu'elle permet d'induire une protection en trans, ne restreignant pas la protection qu'aux cellules transduites, contrairement aux approches précédentes. Dans l'optique d'une application clinique, il est très intéressant de pouvoir induire une protection sur des cellules non transduites, par un effet bystander, permettant ainsi une couverture de protection plus large que les approches classiques. Le groupe du Dr Von Laer, a également exploré cette approche en créant une version sécrétée du peptide C46 permettant d'induire une protection par effet bystander *in vitro* (Egerer et al., 2011). Ce type d'approche permettrait *in vivo* d'induire la production stable d'une molécule antirétrovirale sans aucune contrainte concernant la prise du médicament. De plus, ces deux études pourraient être utilisées chez l'Homme comme stratégie préventive et permettre la production d'Ac neutralisant ou du peptide SAVE au niveau des muqueuses vaginales et rectales diminuant ainsi considérablement le risque de transmission du virus.

3 Effet sur la charge virale

Parmi l'ensemble des stratégies de thérapies géniques ciblant l'entrée, seulement deux ont montré un effet sur la charge virale *in vivo*. La première réalisée dans un modèle de souris-PBL montre une diminution de la charge virale plasmatique de plus d'un log (7.10^4 copies/ml vs 5.10^3 copies/ml) (Perez et al., 2008). La seconde réalisée dans un modèle de souris-Hu montre une forte baisse de 2 log (3.10^5 copies/ml vs 3.10^3 copies/ml) (Joseph, Zheng, Chen, Dutta, Chen, Stiegler, Kunert, Follenzi, & Goldstein, 2010b). Cette grande différence en termes de diminution peut s'expliquer par la différence d'approche que confère chacune des stratégies. En effet, la stratégie développée dans la publication de Joseph et al., repose sur le transfert du gène codant pour l'anticorps neutralisant 2G12 dans les CSH. Cette stratégie permet la production d'Ac neutralisant dans tout l'organisme de la souris, diminuant les risques d'infection, y compris des cellules non transduites. Cette approche est plus apparentée à des stratégies préventives comme les vaccinations. De plus, elle a été réalisée dans le modèle NSG-Hu et ce modèle est connu pour sa faible capacité à reconstituer les muqueuses. Il serait intéressant d'évaluer l'efficacité de cette stratégie à prévenir l'infection dans un modèle BLT, par voie rectale ou vaginale. L'étude de Perez, utilisant des ZFN-CCR5 montre quant à elle la capacité d'une stratégie de thérapie génique à influencer sur la charge virale en diminuant le nombre de cible du virus.

A ma connaissance, seulement deux autres études, en plus de la nôtre, ont exploré l'effet de leurs stratégies d'inhibition d'entrée sur la charge virale dans des souris humanisées. Aucune des trois études n'a pu démontrer un effet sur la charge virale plasmatique. Dans l'étude de Kimpel et al., les souris-PBL présentent des charges virales élevées de l'ordre de 5.10^5 pour les conditions « protégées » et de 1.10^5 dans les conditions contrôles. De plus, dans les deux groupes, on observe une diminution de la charge virale au cours du temps, traduisant probablement une baisse du nombre de cible pour le VIH (Kimpel et al., 2010). Dans notre étude, nous trouvons également des charges virales très élevées, d'environ 5.10^6 dans tous les animaux, quelles que soient les conditions de l'expérience (Article 3). La différence de charge et de cinétique virale entre notre étude et celle de Kimpel et al., peut être imputée aux différences de protocoles pour générer les souris-PBL et pour infecter les souris. Contrairement à notre étude, les lymphocytes T modifiés sont infectés *ex vivo* et injectés en intra péritonéal. La seconde étude publiée ne montrant pas d'effet sur la charge virale, bien que réalisée dans des souris-Hu, présente des résultats assez similaires aux nôtres. En effet, la stratégie protège les cellules de l'infection par le VIH, car il n'y a pas de délétion des

lymphocytes T CD4 dans le sang, ni dans la rate et on observe également un avantage sélectif pour les cellules transduites (Walker et al., 2012).

Notons que la dynamique virale est très différente dans nos mains entre NSG-Hu et NSG-PBL (Article 1 et article 3). Seul le modèle NSG-Hu récapitule la phase primaire de l'infection, dictée par le nombre de cibles disponibles (Article1). Il reste donc possible que notre stratégie puisse avoir un effet sur la charge virale dans le modèle plus physiologique des NSG-Hu infectée par le VIH.

Autres stratégies dans le modèle des souris humanisées

Les stratégies d'inhibition d'entrée ne sont pas les seules approches de thérapies géniques de l'infection par le VIH. On peut citer deux études réalisées dans les souris-PBL, qui utilisent des gènes anti VIH ciblant soit l'intégration du virus soit les LTR (Vets et al. 2012 ; Hauber et al. 2013). Dans la première étude, l'intégrase virale entre en compétition entre le facteur cellulaire LEDGF/p75 et une version de LEDGF/p75 tronqué pour le domaine d'interaction pour la chromatine. La transduction de lymphocytes T CD4 humain, par le vecteur lentiviral portant le gène LEDGF tronqué, permet *in vitro* d'inhiber la réplication virale. De plus, cette approche protège en partie les lymphocytes T CD4 de la délétion *in vivo* et induit également une baisse de la virémie (Vets et al. 2012). Un des risques de cette approche est de créer également une compétition entre le LEDGF/p75 sauvage et la version tronquée, pour des protéines cellulaires. Les auteurs affirment que cette stratégie n'affecte pas la réplication cellulaire des lymphocytes *in vitro*, mais il est difficile d'évaluer les risques qu'aurait une telle approche chez l'Homme.

La seconde stratégie, permet l'expression de la recombinase Tre, sous le contrôle d'un promoteur inducible par le VIH et entraîne l'excision du provirus au niveau des LTR. Cette stratégie induit pour la plupart des souris du groupe traité, une baisse de la charge virale associée à une augmentation des lymphocytes T CD4 (Hauber et al., 2013). La diminution de la charge virale dans cette étude peut s'expliquer par le fait que la stratégie permet de « soigner » une cellule infectée, ce qui *in fine* diminue le nombre de cellules productrices de virus.

L'efficacité de ces deux approches n'a rien à envier aux stratégies ciblant l'entrée et démontre qu'il existe d'autres gènes anti-VIH conférant une protection contre la délétion des lymphocytes T CD4 et permettant d'influer sur la réplication virale. De plus, on peut

envisager de combiner ces stratégies avec des inhibiteurs d'entrée pour créer une deuxième ligne de défense anti VIH dans la cellule.

Cibler l'entrée du virus est-elle réellement la stratégie la plus efficace ?

Comme on vient de le voir, des stratégies de thérapies basées sur d'autres approches ont prouvé leur efficacité *in vitro* et *in vivo*. Selon moi, les stratégies ciblant le virus en amont des étapes de rétrotranscription possèdent deux avantages cruciaux. Le premier est qu'elles préviennent la mort cellulaire induite par la pyroptose, mécanisme déclenché par les infections abortives. Le second est qu'elles diminuent le risque d'émergence de mutants échappant au traitement, générés suite aux erreurs de la rétrotranscriptase. La stratégie la plus efficace ne sera pas une approche unique mais probablement une stratégie combinée où les inhibiteurs d'entrée devront avoir une place importante.

L'intérêt des stratégies combinées

De façon très paradoxale, parmi l'ensemble des stratégies développées dans les souris-PBL, celles qui ont démontré un maximum d'efficacité, à savoir un impact sur la CV, et/ou une protection des lymphocytes T CD4 et/ou un avantage sélectif des cellules transduites, étaient principalement des stratégies uniques. Parmi celles remplissant au moins deux des trois critères précédents, on peut noter les travaux de Perez et al. (ZFN CCR5), ceux de Vets et al. (LEDGF/p75), ceux de Hauber et al. (Recombinase) et ceux de Kimpel et al. (Peptide C46). On peut également ajouter l'étude de Balazs et al. (Ac neutralisant) dont la stratégie confère une protection sur l'ensemble des lymphocytes T CD4. De plus, bien qu'il n'y ait pas de données sur la charge virale plasmatique, on peut toutefois noter que les études immunohistochimiques sur la rate ne permettent pas de détecter des cellules p24⁺ avec l'Ac b12. Les résultats de ma thèse (Article 3) et ceux de (Didigu et al., 2014) représentent les deux seules études utilisant une approche combinée dans les souris NSG-PBL. Ces deux études remplissent deux des trois critères exposés plus haut. Bien que le nombre d'études diffère énormément, on peut noter qu'environ 50% des approches simples satisfont à au moins deux critères, contre 100% des approches combinées dans le modèle NSG-PBL infecté.

Dans le modèle souris-Hu, on note neuf études utilisant une approche simple et quatre une approche multiple. Si on fait la même analyse que précédemment, seules les études de Kitchen et al. (TCR transgénique) et de Holt (ZFN CCR5) pour les approches simples et

l'étude de Walker et al. (shCCR5, leurre de Tar, TRIM5 α) pour les approches combinées, remplissent au moins deux des trois critères précédents. Dans les deux cas, cela représente un peu plus de 20% des études qui montrent des résultats sur plus d'un paramètre.

L'ensemble des approches combinées dans les deux modèles infectés ciblent plusieurs étapes du cycle viral, comme par exemple dans l'étude de Walker et al. qui cible l'entrée dans la cellule (shCCR5), l'entrée dans le noyau (TRIM5 α) et la transcription virale (Leurre Tar). Notre stratégie est actuellement la seule qui cible une seule étape du cycle viral avec deux transgènes. Nous pensons avoir démontré qu'il y a un réel avantage à utiliser cette approche, surtout quand on sait à quel point le virus peut évoluer et échapper à la protection. Comme on l'a vu dans l'introduction le peptide T20 (sous forme soluble) a une barrière génétique faible. Bien que le peptide C46 possède 10 acides aminés de gp41 supplémentaires, il reste néanmoins un risque de voir des mutants dans des stratégies avec le peptide C46 seul. Or, nous avons démontré dans le second article que la combinaison des deux transgènes travaille en synergie et renforce l'efficacité de la protection. On retrouve ce principe dans la trithérapie qui, en règle générale, combine deux inhibiteurs de la rétrotranscriptase associés à un troisième agent.

Comme pour d'autres affections (ex:cancer), les stratégies combinées semblent plus avantageuses que les stratégies simples. Le bénéfice clinique qu'apporte la trithérapie comparé à la monothérapie est un argument qui renforce l'avantage des approches combinées pour traiter l'infection par le VIH.

Moduler l'expression de CCR5 présente-t-il un risque ?

Il est communément admis que le corécepteur CCR5 est une cible incontournable dans les stratégies de thérapies géniques du VIH. Cependant abolir ou moduler l'expression d'une protéine peut entraîner des effets secondaires indésirables pour la cellule et affecter sa fonction. La chimiokine CCL5 (Rantes) est le ligand de haute affinité du récepteur CCR5 (Blanpain et al. 2001) et les interactions entre les chimiokines et leurs récepteurs jouent un rôle majeur dans la surveillance immunitaire et l'inflammation. Dans des conditions pathologiques, comme dans des maladies auto-immunes ou dans des cancers, le recrutement de cellules de l'immunité médié par l'interaction CCR5/CCL5 contribue à la pathologie. En

effet, chez des patients atteints de sclérose en plaque, il a été montré que des lymphocytes T CCR2⁺ CCR5⁺ sont présents dans le liquide cérébro-spinal. Ces derniers produisent de l'INF- γ et des métalloprotéinases matricielles, tous deux impliqués dans l'inflammation du CNS (Sato et al., 2012). De plus, dans l'adénocarcinome pancréatique, les cellules tumorales produisent la chimiokine CCL5 permettant ainsi le recrutement préférentiellement de lymphocytes T régulateurs. Ces derniers favorisent la croissance tumorale en atténuant la réponse immunitaire spécifique contre les cellules tumorales (Tan et al., 2009). Dans des modèles murins, il a été montré que l'administration d'inhibiteur de CCR5 diminuait la sévérité des atteintes pour la sclérose en plaque (Matsui et al., 2002) et la croissance tumorale dans le cancer du pancréas (Tan et al., 2009). Dans le cas du VIH, l'intérêt de cibler CCR5 serait double, d'une part la cellule devient plus résistante à l'infection et d'autre part, affecter la migration cellulaire pourrait diminuer le nombre de cibles susceptibles d'être recrutées puis infectées sur les sites de l'inflammation.

La mutation $\Delta 32$ dans le gène du CCR5 confère aux individus une résistance naturelle très élevée contre l'infection par le VIH. De plus, cette mutation n'induit pas de pathologie connue à ce jour. Cependant, les individus $\Delta 32$ ont une sensibilité accrue au virus du Nil occidental et présentent plus de symptômes que les individus ne portant pas la mutation (Lim et al., 2010). Ce virus est assez peu présent en France et en Europe car seulement quelques cas ont été recensés entre 1979 et 2009 (Calistri et al., 2010). En revanche, les Etats-Unis ont connu quelques épidémies et entre 1999 et 2006, près de 20 000 cas ont été recensés avec un taux de mortalité de 4 % (Lim et al., 2006). En France et aux Etats-Unis il y a respectivement 150 000 et 1,1 million de personnes vivant avec le VIH en 2011 (<https://www.sidaction.org>, <http://www.cdc.gov>). Au vu de la faible incidence du virus du Nil occidental dans ces pays en comparaison au VIH, le rapport bénéfice-risque pour la modulation du corécepteur CCR5 est favorable pour le patient. De plus, notre stratégie n'abolit pas complètement l'expression du récepteur, contrairement au zing finger nucléase. Cette approche douce devrait permettre de diminuer la susceptibilité des cellules à l'infection tout en préservant en partie leurs fonctions.

Dynamique de la délétion des lymphocytes T CD4⁺ CCR5⁺ *in vivo*

Nos résultats chez la souris humanisée NSG-Hu et NSG-PBL montrent une délétion des lymphocytes T CD4⁺CCR5⁺ moins prononcée dans le sang que dans les organes lymphoïdes (article 1 et 3). Cette observation confirme les résultats observés chez les patients infectés où la délétion des lymphocytes T CD4⁺CCR5⁺ a majoritairement lieu dans le tractus gastro-

intestinal (Brenchley et al., 2004) (Mehandru et al., 2004). L'absence de délétion des lymphocytes T CD4⁺CCR5⁺ avait déjà été notée dans une étude pilote (Zaunders et al. 2001). Nos résultats rapprochent donc un peu plus le modèle de la réalité physiologique et permet d'envisager des études visant à mieux comprendre le rôle de la migration cellulaire sous l'influence de CCL5/CCR5 dans la physiopathologie de l'infection.

Dynamique et évolution virale

Les stratégies ciblant uniquement CCR5 chez des patients déjà infectés ont de grande chance de sélectionner des virus. Un phénomène similaire a déjà été observé chez des patients traités au Maraviroc (Westby et al., 2006). De plus, nous avons démontré que la région V3 de la gp120, impliquée dans la reconnaissance du corécepteur, est dynamique et ce même en l'absence de toute pression de sélection (immunitaire ou ARV) (Article 1). Dans notre modèle de souris humanisées, NSG-Hu, nous avons constaté que le virus différait de la séquence consensus au niveau de la boucle V3 dans 4 souris sur 6. Une analyse bio-informatique sur le site Geno2pheno (le site de référence pour les cliniciens voulant déterminer le tropisme du virus) a montré qu'aucun virus n'avait spontanément changé de tropisme. En revanche, un changement de tropisme est observé pour une souris sur 6 dans des souris humanisées BRG-Hu (Ince et al., 2010). Pour finaliser l'étude présentée dans l'article 3, nous allons explorer la diversité virale de la boucle V3 de la gp120 mais aussi de la gp41. Le séquençage à haut débit de l'intégralité de l'enveloppe virale permettra d'identifier précisément les acides aminés mutés, la fréquence de ces mutations et le changement de tropisme dans les conditions où le vecteur thérapeutique impose une pression de sélection.

Amélioration de notre stratégie

Au final, seulement 5 études sur les 28 recensés dans les souris humanisées (PBL ou Hu) ont permis d'influer sur la charge virale (Perez et al. 2008 ; Vets et al. 2012; Hauber et al. 2013 ; Joseph et al. 2010 ; Kitchen et al. 2012). Notre stratégie dans ce modèle, comme pour les 23 études, n'affecte pas la charge virale et ne remplit que deux des trois critères énoncés précédemment. Cependant, notre vecteur thérapeutique pourrait contenir d'autres gènes anti-VIH car la cassette du peptide C46 et de l'intrakine ne fait que 0.9 kb. Dans la partie suivante, j'évoque donc les améliorations que nous pourrions apporter à notre vecteur en ajoutant des gènes pour accroître son pouvoir anti-VIH.

1 Virus Inhibitor Peptide (VIRIP)

Comme nous l'avons vu dans l'introduction, il existe un autre peptide permettant d'inhiber la fusion. Ce dernier, dénommé Virus Inhibitor Peptide (VIRIP), comme le peptide C46, cible la gp41 mais sur une région différente, au niveau des peptides de fusions (Münch et al., 2007). Il serait intéressant de vectoriser ce peptide pour induire son expression à la membrane et de tester son action en combinaison avec le peptide C46 et l'intrakine. Ces deux peptides ciblent la même molécule ; ils devraient donc pouvoir travailler en synergie, si la conformation 3D le permet et rendre cette combinaison difficile à contourner pour le virus. Ce vecteur tricistronique comporterait donc 2 inhibiteurs de fusions associés à l'intrakine P2 et il pourrait complètement verrouiller l'entrée du virus si VIRIP présente également une synergie d'action avec l'intrakine. Un des inconvénients est qu'il se pourrait également que la cellule portant ces deux molécules à sa surface soit reconnue par le système immunitaire et éliminée ou neutralisée. L'effet de ces anticorps anti-gp41 sur l'infection par le VIH pourrait néanmoins être bénéfique.

2 Autres transgènes

Comme je l'ai évoqué précédemment, on peut également se baser sur le même schéma que la trithérapie, dont l'efficacité n'est pas à démontrer, et cibler une étape avec deux gènes, et une autre étape du cycle avec un troisième gène anti-VIH. Dans notre approche, nous possédons déjà les deux gènes qui ciblent la même étape (l'entrée), c'est pourquoi nous pourrions ajouter le gène de la recombinaise Tre sous le contrôle d'un promoteur Tat-dépendant et donc exprimer uniquement dans les cellules infectées. Cette approche permettrait de rendre presque impossible l'émergence de résistances car chaque mutant échappant aux inhibiteurs d'entrée seraient excisés du génome de la cellule par l'action de la recombinaise Tre. Ainsi, la recombinaise Tre bloquerait complètement la diffusion du variant génétique résistant. Cette idée de faire exprimer un transgène conditionnel dans les cellules infectées par le VIH est à l'origine des vecteurs mobilisables qui vont donc pouvoir exprimer leur transgène uniquement en présence du VIH.

3 Vecteur mobilisable

Une approche pour améliorer l'efficacité de notre stratégie est donc l'utilisation de vecteurs thérapeutiques mobilisables compétant. Une étude parue dans Nature Protocol en 1996, a montré qu'il était possible de construire un vecteur 'parasite' du VIH. Leur

construction repose sur trois ribozymes qui ciblent les LTR du VIH et inhibent la production de particules infectieuses (Dropulić et al. 1996). Un point crucial est que les LTR du vecteur ont été modifiés pour les rendre résistants à ces ribozymes. Le résultat de cette construction permet de stopper la production virale dans une cellule, au profit de la production de particules thérapeutiques pseudotypées avec les protéines d'enveloppe du VIH. L'intérêt de cette approche est double puisqu'elle va permettre d'inhiber la réplication virale tout en permettant la diffusion du vecteur thérapeutique aux mêmes cellules cibles que le VIH chez le patient. Un modèle mathématique montre que ce type d'approche pourrait permettre de contrôler totalement la délétion des cellules sans toutefois éliminer le VIH (Weinberger et al. 2003).

En me basant sur ces résultats, j'ai imaginé un vecteur couplant notre approche d'inhibition d'entrée avec un vecteur mobilisable. L'intérêt de combiner ces deux technologies est de permettre la diffusion du vecteur thérapeutique dans l'organisme dans des sanctuaires du VIH difficilement atteignable par les drogues. En effet, il a été montré que le VIH affectait la motilité des cellules et s'en servait comme véhicule pour favoriser sa diffusion (Murooka et al., 2012). Mon approche devrait permettre de détourner ce mécanisme au profit du vecteur. Notons que les cellules transduites seront protégées d'une "surinfection" par le vecteur thérapeutique, l'inhibition d'entrée bloquant autant les virus sauvages que les virus thérapeutiques, ceux-ci utilisant l'enveloppe du VIH pour leur diffusion. Ce dernier paramètre est très important car il diminue les risques liés à de trop nombreuses insertions dans le génome. La figure 18, schématise mon idée:

La transduction des lymphocytes T CD4 issus de patients infectés par le VIH et présentant une charge virale pourrait se faire dans un premier temps *ex vivo* mais l'objectif *in fine* serait d'injecter directement le vecteur *in vivo*. Le vecteur mobilisable comporterait les LTR modifiés permettant l'expression inductible des ribozymes par le VIH, ainsi que la cassette d'inhibition d'entrée. Comme dans les articles 2 et 3 la co-expression du peptide C46 et de l'intrakine P2 serait assurée par le promoteur EF1 α . Dans les cellules infectées, cette construction devrait permettre d'inhiber la production de virion sauvage du VIH au profit du vecteur thérapeutique. Dans des cellules non infectées, seuls les gènes sous le contrôle du promoteur EF1 α seront exprimés, inhibant ainsi l'entrée du VIH dans cette cellule. Cette approche devrait permettre de diffuser la protection contre le virus dans tout l'organisme en transduisant *in situ* les cellules cibles du VIH. De plus, de par l'aspect mobilisable du vecteur, sa production devrait décroître en parallèle de la charge virale. Ce type de stratégie présente l'avantage et l'inconvénient qu'un individu infecté par le VIH et traité par ce vecteur pourrait

potentiellement diffuser le virus thérapeutique par voie sexuelle comme pour le VIH. Dans le cas d'une transmission chez un autre individu déjà infecté par le VIH, le vecteur thérapeutique pourrait également se répliquer et aider le patient à contrôler son infection. Dans le cas d'une transmission chez un individu sain, la transduction de lymphocytes T ou de macrophages au niveau des muqueuses pourrait jouer un rôle protecteur contre le VIH. Cependant, malgré ces aspects attrayants ce type de stratégie pose un problème de sécurité biologique ainsi qu'éthique. En effet, des recombinaisons entre le VIH et le vecteur thérapeutique pourraient générer un nouveau virus potentiellement pathogène. De plus, est-il éthique qu'un traitement, induisant des modifications génétiques, puisse se diffuser à l'insu des individus et ce malgré le bénéfice qu'il pourrait engendrer ?

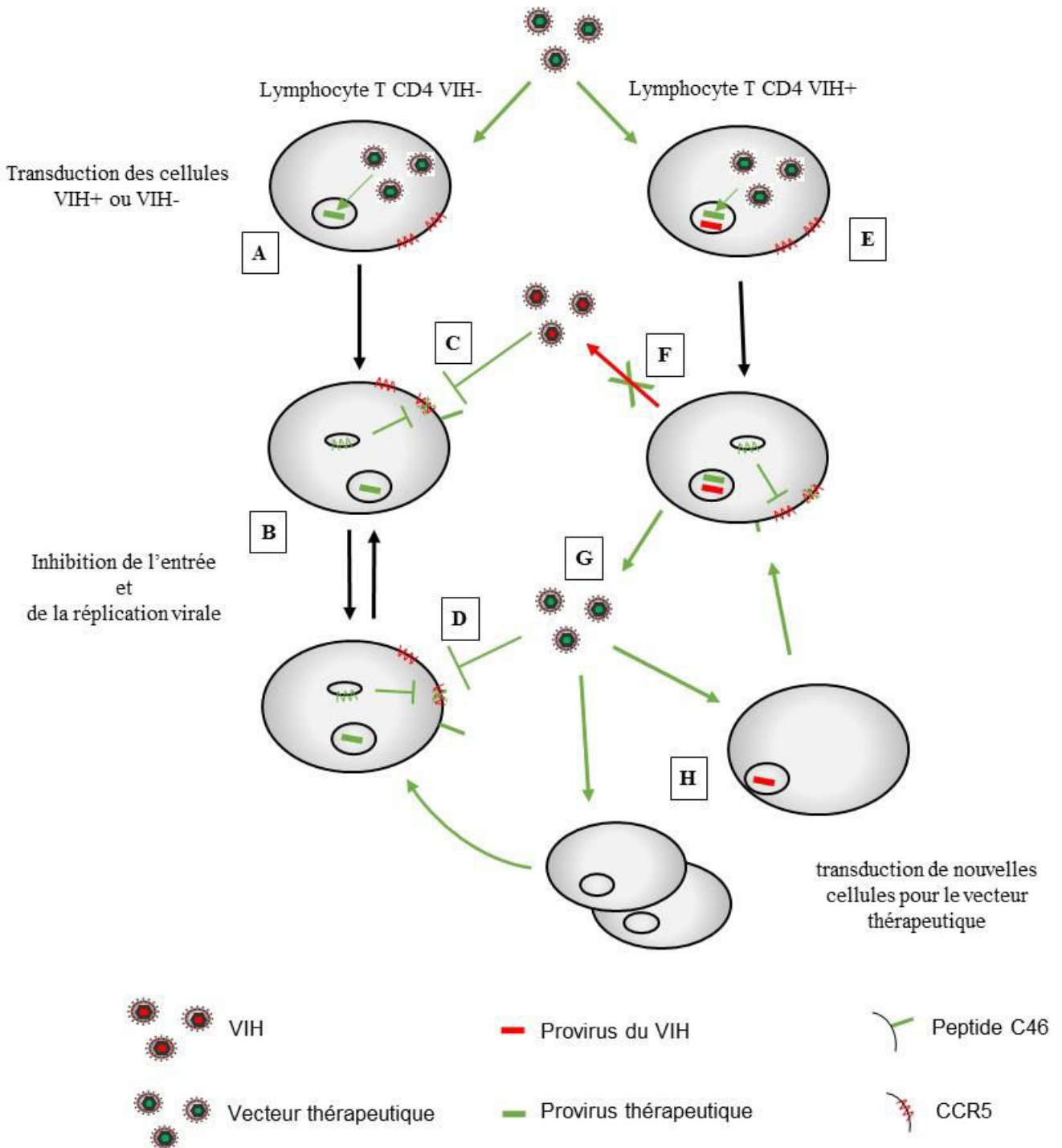


Figure 18 : Schéma d'une stratégie d'inhibition d'entrée avec un vecteur mobilisable. Le vecteur thérapeutique peut transduire soit un lymphocyte T CD4 non infecté (A), soit infecté par le VIH (E). Dans le cas de cellules non infectées, la transduction permet la synthèse du peptide C46 et de l'intracrine P2 (B), inhibant l'entrée du virus (C) et la surinfection par le vecteur thérapeutique (D). Dans le cas de cellules déjà infectées (E), la production du virus est inhibée (F) par les ribozymes et la cellule produit des vecteurs thérapeutiques à la place (G).

Les nouveaux virus thérapeutiques produits en (G) pourront alors transduire de nouvelles cellules infectées ou non (H).

Les perspectives cliniques

1 Transfert de gènes dans les LT

Les immunothérapies basées sur le transfert de lymphocyte T sont de plus en plus courantes. Ces dernières sont basées sur la capacité d'un lymphocyte T à reconnaître et induire une réponse contre un antigène donné. Les trois principales approches sont (Yee et al. 2014):

- La sélection et l'amplification d'un lymphocyte T possédant un TCR reconnaissant l'Ag cible.

- La purification et l'amplification de lymphocytes T infiltrant une tumeur (TIL).

- L'introduction d'un récepteur chimérique spécifique d'un Ag (CAR/TCR) par transfert de gènes.

Ces différentes stratégies ont été testées dans le cadre de cancer comme des lymphomes ou des mélanomes et sont souvent associées à une chimiothérapie ou une radiothérapie. Ce conditionnement favorise à la fois la prise de greffe et affecte également les cellules cancéreuses.

Dans le cadre du VIH, le transfert adoptif de lymphocytes T a pour objectif non plus d'induire une réponse immunitaire contre les cellules infectées, hormis pour les stratégies utilisant des CAR/TCR (Joseph et al., 2008), (Kitchen et al. 2012), mais vise à reconstituer une population non clonale protégée contre l'infection. Dans ce dernier cas, le transfert adoptif de lymphocytes T présente un risque clinique faible pour le patient. En effet, la greffe de lymphocytes T autologues ne nécessite pas de conditionnement pré-greffe et les seuls effets secondaires observés sont à très court terme et modérés. On peut noter que dans un essai réalisé en 2007, six patients sur 10 ont présenté des symptômes grippaux (fièvre, fatigue et maux de tête) pendant 24H après la greffe. Les auteurs attribuent ces symptômes aux faibles quantités de Diméthylsulfoxyde (DMSO) présent dans la suspension cellulaire injectée aux patients (Lunzen et al., 2007). De plus, pendant toute la durée de l'étude (24 à 31 mois), aucun patient n'a déclenché de graves pathologies. Une autre étude démontre également l'absence d'effet secondaire grave sur du long terme (plus de 10 ans) (Scholler et al., 2012).

Le principal défaut du transfert adoptif de lymphocytes T est la disparition des cellules transduites dans l'organisme du patient et ce malgré l'avantage sélectif. La précédente étude

détecte toujours des cellules transduites neuf ans après la greffe (Scholler et al., 2012) mais ce résultat reste anecdotique. En effet, dans la plus part des autres essais cliniques, on observe une baisse des cellules transduites au cours du temps (Tebas et al., 2014) et dans certains essais, la majorité des patients n'ont plus de cellules transduites détectables une année après la greffe (Tebas et al., 2013) (Lunzen et al., 2007).

Ces résultats montrent que la technologie de transfert de gènes dans les lymphocytes T est mûre avec des améliorations constantes qui y sont apportées (Merten et al., 2011)(Liebert et al., 2000). Ainsi, on pourrait envisager le passage de notre stratégie vers les patients. Le plus intéressant serait de s'adresser à des patients multi résistants en échec thérapeutique. D'une part, ces patients présentent des charges virales élevées ce qui favoriserait l'avantage sélectif conféré aux cellules modifiées. D'autre part, le succès de la stratégie serait rapidement mesurable dans des essais de petite échelle.

2 Transfert de gènes dans les CSH

Contrairement au transfert adoptif des lymphocytes T, la greffe de précurseurs hématopoïétiques devrait permettre de générer sur du long terme des cellules portant les gènes thérapeutiques. Ces stratégies ont déjà fait preuve de leur efficacité dans des maladies génétiques comme SCID lié à X ou le déficit ADA (Adenosine deaminase) (Cavazzana-Calvo et al.; 2000)(Gaspar et al., 2011). Dans le cadre du VIH, deux approches peuvent être envisagées. La première consiste en une greffe autologue de CSH modifiées avec ou sans conditionnement pré-greffe et la seconde consiste à greffer des CSH allogéniques issues d'un donneur compatible. La majorité des essais ont suivi la première stratégie (5/7) et ont ainsi éliminé les risques de GVH associé avec les greffes de CSH allogéniques. Cependant, dans tous ces essais, la fréquence des lymphocytes T issus des cellules transduites est restée faible dans le sang. Notons que la majorité de ces études utilisaient les vecteurs dérivés du MLV, connus pour leur propension à être éteints par des mécanismes épigénétiques (Gram et al. 1998). La différence majeure entre ces stratégies et celles traitant les déficits immunitaires, est que dans ces dernières les cellules souches hématopoïétiques transduites ont un fort avantage sélectif qu'on ne retrouve pas dans un contexte VIH, puisque l'avantage sélectif s'opère sur les lymphocytes. Il reste encore aujourd'hui un doute sur la capacité du VIH à infecter des précurseurs hématopoïétiques. Certaines données suggèrent que ces cellules peuvent être infectées et que le virus reste en latence sur du long terme (Li et al. 2012)(Baillou et al., 2003). Une étude plus récente utilise donc un lentivirus déficient pour introduire des gènes de

résistance au VIH dans les CSH autologue dans le cadre d'un traitement contre des lymphomes non Hodgkiniens chez des patients infectés par le VIH. Dans cette étude, la greffe a permis de traiter le lymphome mais elle n'a apporté aucune amélioration clinique concernant l'infection par le VIH et les auteurs concluent que la fréquence de cellules protégées dans le sang était probablement trop faible pour influencer sur ces paramètres (DiGiusto et al., 2010). L'intérêt de ce type de stratégies est double puisqu'elles permettraient de traiter le lymphome en plus de l'infection par le VIH. Cependant, bien que notre stratégie soit parfaitement adaptée à un transfert de gènes dans les CSH, je pense que cette approche présente plus de difficultés qu'un transfert adoptif des lymphocytes T matures. En effet, le transfert de gènes dans les CSH par des vecteurs lentiviraux présente une efficacité moindre que dans les lymphocytes T et une fréquence trop faible de CSH transduites ne semble pas suffisant pour induire une protection contre le virus. La greffe de CSH modifiées vise à reproduire la stratégie employée pour le patient de Berlin, cependant dans ce dernier cas, le succès thérapeutique est en grande partie dû à une reconstitution totale du patient avec les cellules portant la mutation $\Delta 32$ (Hütter et al. 2009). Au vu de ces résultats, il semblerait que pour une efficacité optimale dans un contexte ne conférant pas d'avantage sélectif aux cellules transduites greffées, il est indispensable d'augmenter l'efficacité du transfert de gènes dans ces cellules et/ou de les amplifier *in vitro*, avant la greffe. L'utilisation d'un inhibiteur du protéasome, le MG132, est connu pour augmenter l'efficacité du transfert de gènes dans les CSH (Leuci et al., 2011). En revanche, bien que de nombreuses molécules aient été testées, aucune approche ne permet une expansion massive des CSH *in vitro*, tout en conservant leurs potentiels hématopoïétiques (Walasek et al. 2012). En conclusion, l'amélioration de ces deux derniers paramètres me semble indispensable pour que les CSH greffées puissent générer une population de lymphocytes T protégés, suffisante pour contrôler l'infection. De plus, dans le cas d'une greffe comportant 100% de cellules transduites, on pourrait même envisager l'éradication du virus chez le patient comme pour le patient de Berlin.

3 Risques associés à une réponse immune

Une réponse immunitaire contre le peptide C46 pourrait entraîner soit l'élimination des cellules transduites par les lymphocytes T cytotoxiques, soit la production d'Ac neutralisant son action. Les auteurs de l'étude utilisant le peptide C46 dans des lymphocytes T, se sont intéressés à cette question (Lunzen et al., 2007). Sur les dix patients testés, 8 présentent des Ac dirigés contre le peptide avant même la greffe des cellules transduites et chez les deux

patients négatifs, aucune séroconversion n'a été observée après la greffe. Les auteurs ont exclu l'hypothèse de l'élimination des cellules transduites par un mécanisme humoral car les individus présentant une fréquence élevée de cellules transduites (comparativement aux autres patients) avaient également de forte concentration d'anticorps. De plus, aucune réponse cytotoxique n'est révélée chez les patients, via des analyses ELISpot réalisées à plusieurs moments de l'étude.

Le second transgène utilisé dans notre stratégie est dérivé de la protéine CCL5, qui est naturellement sécrétée par beaucoup de cellules comme les lymphocytes, les plaquettes, les macrophages, les éosinophiles, les fibroblastes, les cellules endothéliales, épithéliales et de l'endomètre (Marqueset al. 2013). De plus, l'intrakine P2 ne comporte que 7 acides aminés différents par rapport à CCL5, c'est pourquoi nous pensons que le risque de générer une réponse immunitaire contre ce transgène est faible.

Finalement, au vu des résultats chez les patients traités avec le peptide C46 et la forte homologie de séquence entre l'intrakine P2 et CCL5, nous pensons que le risque d'induire une réponse immunitaire contre cette combinaison de transgène est faible. De plus, nous utilisons l'Ac neutralisant 2F5 pour détecter le peptide C46 (Article 2 et 3), cet Ac est connu pour se fixer sur la gp41, comme l'Ac 4E10 (fig 15 de l'introduction)(Burton et al., 2004). Dans le cas, où le peptide C46 induirait une réponse humorale, il est probable que les Ac générés ciblent également la gp41, ce qui pourrait être favorable au patient. Notre stratégie de thérapie génique pourrait alors se doubler d'un intérêt vaccinal.

Références Bibliographiques

- A, F. D. & Young, J. a. (1998). HIV-1: fifteen proteins and an RNA. *Annual Review of Biochemistry*, 67, 1–25. doi:10.1146/annurev.biochem.67.1.1
- Akkina, R., Berges, B. K., Palmer, B. E., Remling, L., Neff, C. P., Kuruvilla, J., ... Akkina, S. R. (2011). Humanized Rag1^{-/-} gc^{-/-} mice support multilineage hematopoiesis and are susceptible to HIV-1 infection via systemic and vaginal routes. *PloS One*, 6(6), 1–8. doi:10.1371/journal.pone.0020169
- Allers, K., Hütter, G., Hofmann, J., Loddenkemper, C., Rieger, K., Thiel, E. & Schneider, T. (2011). Evidence for the cure of HIV infection by CCR5 Δ 32/ Δ 32 stem cell transplantation. *Blood*, 117(10), 2791–9. doi:10.1182/blood-2010-09-309591
- Ameisen, J. C. & Capron, A. (1991). Cell dysfunction and depletion in AIDS: the programmed cell death hypothesis. *Immunology Today*, 12, 102–105. doi:10.1016/0167-5699(91)90092-8
- An, D. S., Qin, F. X., Auyeung, V. C., Mao, S. H., Sam, K. P., Baltimore, D. & Chen, I. S. Y. (2008). Expression in Primary Human Lymphocytes via Lentiviral Vectors. *Molecular Therapy*, 14(4), 494–504. doi:10.1016/j.ymthe.2006.05.015.Optimization
- Anastassopoulou, C. & Ketas, T. (2012). Effects of sequence changes in the HIV-1 gp41 fusion peptide on CCR5 inhibitor resistance. *Virology*, 428(2), 86–97. doi:10.1016/j.virol.2012.03.008.Effects
- Anderson, J. & Akkina, R. (2008). Human immunodeficiency virus type 1 restriction by human-rhesus chimeric tripartite motif 5 α (TRIM 5 α) in CD34(+) cell-derived macrophages in vitro and in T cells in vivo in severe combined immunodeficient (SCID-hu) mice transplanted with human fe. *Human Gene Therapy*, 19(3), 217–28. doi:10.1089/hum.2007.108
- Anderson, J., Javien, J., Nolta, J. & Bauer, G. (2009). Preintegration HIV-1 inhibition by a combination lentiviral vector containing a chimeric TRIM5 α protein, a CCR5 shRNA, and a TAR decoy. *Molecular Therapy*, 17(12), 2103–2114. doi:10.1038/mt.2009.187
- Anderson, J. L., Campbell, E. M., Wu, X., Vandegraaff, N., Engelman, A. & Hope, T. J. (2006). Proteasome inhibition reveals that a functional preintegration complex intermediate can be generated during restriction by diverse TRIM5 proteins. *Journal of Virology*, 80(19), 9754–60. doi:10.1128/JVI.01052-06
- Anderson, J., Li, M.-J., Palmer, B., Remling, L., Li, S., Yam, P., ... Akkina, R. (2007). Safety and efficacy of a lentiviral vector containing three anti-HIV genes, CCR5 ribozyme, tat-rev siRNA, and TAR decoy in SCID-hu mouse-derived T cells. *Molecular Therapy : The Journal of the American Society of Gene Therapy*, 15(6), 1182–8. doi:10.1038/sj.mt.6300157
- Anderson, J. S., Walker, J., Nolta, J. a & Bauer, G. (2009). Specific transduction of HIV-susceptible cells for CCR5 knockdown and resistance to HIV infection: a novel method for targeted gene therapy and intracellular immunization. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes (1999)*, 52(2), 152–61. doi:10.1097/QAI.0b013e3181b010a0
- Ao, Z., Yao, X., Cohen, É. A. & Cohen, A. (2004). Assessment of the Role of the Central DNA Flap in Human Immunodeficiency Virus Type 1 Replication by Using a Single Cycle Replication System. *Journal of Virology*, 78, 3170–3177. doi:10.1128/JVI.78.6.3170
- ASGCT, A. S. of G. & C. T. (2014). American Society of Gene & Cell Therapy: ASGCT. *Molecular Therapy*, 22(May).

- Baggiolini, M. (1998). Chemokines and leukocyte traffic. *Nature*, 392(6676), 565–8. doi:10.1038/33340
- Baillou, C., Simon, A., Leclercq, V., Azar, N., Rosenzweig, M., Herson, S., ... Lemoine, F. M. (2003). Highly active antiretroviral therapy corrects hematopoiesis in HIV-1 infected patients: interest for peripheral blood stem cell-based gene therapy. *AIDS (London, England)*, 17(4), 563–74. doi:10.1097/01.aids.0000050821.06065.91
- Balazs, A. B., Chen, J., Hong, C. M., Rao, D. S., Yang, L. & Baltimore, D. (2011). Antibody-based protection against HIV infection by vectored immunoprophylaxis. *Nature*, 481(7379), 81–84. doi:10.1038/nature10660
- Banerjea, A., Li, M., Bauer, G. & Remling, L. (2003). Inhibition of HIV-1 by lentiviral vector-transduced siRNAs in T lymphocytes differentiated in SCID-hu mice and CD34+ progenitor cell-derived macrophages. *Molecular Therapy*, 8(1), 62–71. doi:10.1016/S1525-0016(03)00140-0
- Banerjea, A., Li, M.-J., Remling, L., Rossi, J. & Akkina, R. (2004). Lentiviral transduction of Tar Decoy and CCR5 ribozyme into CD34+ progenitor cells and derivation of HIV-1 resistant T cells and macrophages. *AIDS Research and Therapy*, 1(1), 2. doi:10.1186/1742-6405-1-2
- Barré-Sinoussi, F., Chermann, J. C., Rey, F., Nugeyre, M. T., Chamaret, S., Gruest, J., ... Montagnier, L. (1983). Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science*, 220, 868–871.
- Berges, B., Akkina, S. & Folkvord, J. (2008). Mucosal transmission of R5 and X4 tropic HIV-1 via vaginal and rectal routes in humanized Rag2^{-/-} γc^{-/-}(RAG-hu) mice. *Virology*, 373, 342–351. doi:10.1016/j.virol.2007.11.020
- Bernardin, F. & Kong, D. (2005). Human immunodeficiency virus mutations during the first month of infection are preferentially found in known cytotoxic T-lymphocyte epitopes. *Journal of Virology*, 79, 11523–11528. doi:10.1128/JVI.79.17.11523
- Bishop, K. N., Verma, M., Kim, E. Y., Wolinsky, S. M. & Malim, M. H. (2008). APOBEC3G inhibits elongation of HIV-1 reverse transcripts. *PLoS Pathogens*, 4(12), 1–11. doi:10.1371/journal.ppat.1000231
- Blanpain, C., Buser, R., Power, C., Edgerton, M., Buchanan, C., Mack, M., ... Proudfoot, A. (2001). A chimeric MIP-1α/RANTES protein demonstrates the use of different regions of the RANTES protein to bind and activate its receptors. *Journal of Leukocyte Biology*, 69(June), 977–985.
- Bleul, C. C., Wu, L., Hoxie, J. ., Springer, T. . & Mackay, C. R. (1997). The HIV coreceptors CXCR4 and CCR5 are differentially expressed and regulated on human T lymphocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(5), 1925–30.
- Bowles, D. E., McPhee, S. W. J., Li, C., Gray, S. J., Samulski, J. J., Camp, A. S., ... Samulski, R. J. (2012). Phase 1 gene therapy for Duchenne muscular dystrophy using a translational optimized AAV vector. *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy*, 20(2), 443–55. doi:10.1038/mt.2011.237
- Brainard, D. M., Seung, E., Frahm, N., Cariappa, A., Bailey, C. C., Hart, W. K., ... Tager, A. M. (2009). Induction of robust cellular and humoral virus-specific adaptive immune responses in human immunodeficiency virus-infected humanized BLT mice. *Journal of Virology*, 83(14), 7305–21. doi:10.1128/JVI.02207-08
- Brake, O. Ter, Legrand, N. & Eije, K. Von. (2009). Evaluation of safety and efficacy of RNAi against HIV-1 in the human immune system (Rag2^{-/-}-gc^{-/-}) mouse model. *Gene Therapy*, 16(1), 148–53. doi:10.1038/gt.2008.124
- Brauer, F., Schmidt, K., Zahn, R. C., Richter, C., Radeke, H. H., Schmitz, J. E., ... Egerer, L. (2013). A rationally engineered anti-HIV peptide fusion inhibitor with greatly reduced

- immunogenicity. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 57(2), 679–88. doi:10.1128/AAC.01152-12
- Braun, C. J., Boztug, K., Paruzynski, A., Witzel, M., Schwarzer, A., Rothe, M., ... Klein, C. (2014). Gene therapy for Wiskott-Aldrich syndrome--long-term efficacy and genotoxicity. *Science Translational Medicine*, 6(227), 227ra33. doi:10.1126/scitranslmed.3007280
- Brehm, M. a, Cuthbert, A., Yang, C., Miller, D. M., DiIorio, P., Laning, J., ... Greiner, D. L. (2010). Parameters for establishing humanized mouse models to study human immunity: analysis of human hematopoietic stem cell engraftment in three immunodeficient strains of mice bearing the IL2rgamma(null) mutation. *Clinical Immunology (Orlando, Fla.)*, 135(1), 84–98. doi:10.1016/j.clim.2009.12.008
- Brenchley, J. M., Paiardini, M., Knox, K. S., Asher, A. I., Cervasi, B., Asher, T. E., ... Douek, D. C. (2008). Differential Th17 CD4 T-cell depletion in pathogenic and nonpathogenic lentiviral infections. *Blood*, 112(7), 2826–35. doi:10.1182/blood-2008-05-159301
- Brenchley, J. M., Price, D. a, Schacker, T. W., Asher, T. E., Silvestri, G., Rao, S., ... Douek, D. C. (2006). Microbial translocation is a cause of systemic immune activation in chronic HIV infection. *Nature Medicine*, 12(12), 1365–71. doi:10.1038/nm1511
- Brenchley, J. M., Schacker, T. W., Ruff, L. E., Price, D. A., Taylor, J. H., Beilman, G. J., ... Douek, D. C. (2004). CD4 T Cell Depletion during all Stages of HIV Disease Occurs Predominantly in the Gastrointestinal Tract. *The Journal of Experimental Medicine*, 200(6), 749–759. doi:10.1084/jem.20040874
- Brooks, D. & Kitchen, S. (2001). Generation of HIV latency during thymopoiesis. *Nature Medicine*, 7, 459–464.
- Buchbinder, S. P., Mehrotra, D. V, Duerr, A., Fitzgerald, D. W., Mogg, R., Li, D., ... Robertson, M. N. (2008). Efficacy assessment of a cell-mediated immunity HIV-1 vaccine (the Step Study): a double-blind, randomised, placebo-controlled, test-of-concept trial. *Lancet*, 372(9653), 1881–1893. doi:10.1016/S0140-6736(08)61591-3
- Bukrinsky, M. (2004). A hard way to the nucleus. *Molecular Medicine*, 10(1-6), 1–5.
- Burton, D. R., Desrosiers, R. C., Doms, R. W., Koff, W. C., Kwong, P. D., Moore, J. P., ... Wyatt, R. T. (2004). HIV vaccine design and the neutralizing antibody problem. *Nature Immunology*, 5(3), 233–6. doi:10.1038/ni0304-233
- Calistri, P., Giovannini, A., Hubalek, Z., Ionescu, A., Monaco, F., Savini, G. & Lelli, R. (2010). Epidemiology of west nile in europe and in the mediterranean basin. *The Open Virology Journal*, 4, 29–37. doi:10.2174/1874357901004020029
- Cameron, P. U., Freudenthal, P. S., Barker, J. M., Gezelter, S., Inaba, K. & Steinman, R. M. (1992). Dendritic cells exposed to human immunodeficiency virus type-1 transmit a vigorous cytopathic infection to CD4+ T cells. *Science*, 257(5068), 383–7.
- Cao, X., Shores, E. W., Hu-Li, J., Anver, M. R., Kelsall, B. L., Russell, S. M., ... Bloom, E. T. (1995). Defective lymphoid development in mice lacking expression of the common cytokine receptor gamma chain. *Immunity*, 2(3), 223–38.
- Carlsson, R., Mårtensson, C., Kalliomaki, S., Ohlin, M. & Borrebaeck, C. . A. . (1992). culture system exhibiting several parameters found in a normal humoral immune response and are a source of immunocytes for the production of human monoclonal. *The Journal of Immunology*, 148(4), 1065–1071.
- Cartier, N., Hacein-Bey-Abina, S., Bartholomae, C. C., Bougnères, P., Schmidt, M., Kalle, C. Von, ... Aubourg, P. (2012). Lentiviral hematopoietic cell gene therapy for X-linked adrenoleukodystrophy. *Methods in Enzymology*, 507, 187–98. doi:10.1016/B978-0-12-386509-0.00010-7

- Cavazzana-Calvo, M., Payen, E., Negre, O., Wang, G., Hehir, K., Fusil, F., ... Leboulch, P. (2010). Transfusion independence and HMGA2 activation after gene therapy of human β -thalassaemia. *Nature*, *467*(7313), 318–22. doi:10.1038/nature09328
- Cavazzana-Calvo, Marina; Hacein-Bey, Salima; de Saint Basile, Genevieve; Gross, Fabian; Yvon, Eric; Nusbaum, Patrick; Selz, Françoise; Hue, Christophe; Certain, Stephanie; Casanova, Jean-Laurent; Bousso, Philippe; Le Deist, Françoise; Fischer, A. (2000). Gene Therapy of Human Severe Combined Immunodeficiency (SCID)-X1 Disease. *Science*, *288*(5466), 669–672. doi:10.1126/science.288.5466.669
- Chahroudi, A., Bosinger, S. E., Vanderford, T. H., Paiardini, M. & Silvestri, G. (2012). Natural SIV hosts: showing AIDS the door. *Science*, *335*(6073), 1188–93. doi:10.1126/science.1217550
- Chan, D. C., Fass, D., Berger, J. M. & Kim, P. S. (1997). Core structure of gp41 from the HIV envelope glycoprotein. *Cell*, *89*(2), 263–73.
- Chan, E., Towers, G. J. & Qasim, W. (2014). Gene therapy strategies to exploit TRIM derived restriction factors against HIV-1. *Viruses*, *6*(1), 243–63. doi:10.3390/v6010243
- Chen, Z., Luckay, A., Sodora, D. L., Telfer, P., Reed, P., Gettie, A., ... Ho, D. D. (1997). seroprevalence and characterization of a distinct HIV-2 genetic subtype from the natural range of simian immunodeficiency virus-infected sooty mangabeys . Human Immunodeficiency Virus Type 2 (HIV-2) Seroprevalence and Characterization of a Distinct HIV-. *Journal of Virology*, *71*(5), 3953–3960.
- Cherepanov, P., Maertens, G., Proost, P., Devreese, B., Van Beeumen, J., Engelborghs, Y., ... Debyser, Z. (2003). HIV-1 integrase forms stable tetramers and associates with LEDGF/p75 protein in human cells. *The Journal of Biological Chemistry*, *278*(1), 372–81. doi:10.1074/jbc.M209278200
- Choi, B., Chun, E., Kim, M., Kim, S.-T., Yoon, K., Lee, K.-Y. & Kim, S. J. (2011). Human B cell development and antibody production in humanized NOD/SCID/IL-2R γ (null) (NSG) mice conditioned by busulfan. *Journal of Clinical Immunology*, *31*(2), 253–64. doi:10.1007/s10875-010-9478-2
- Chomont, N., El-Far, M., Ancuta, P., Trautmann, L., Procopio, F. a, Yassine-Diab, B., ... Sékaly, R.-P. (2009). HIV reservoir size and persistence are driven by T cell survival and homeostatic proliferation. *Nature Medicine*, *15*(8), 893–900. doi:10.1038/nm.1972
- Chun, T. W., Engel, D., Berrey, M. M., Shea, T., Corey, L. & Fauci, a S. (1998). Early establishment of a pool of latently infected, resting CD4(+) T cells during primary HIV-1 infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *95*(15), 8869–73.
- Chun, T. W., Stuyver, L., Mizell, S. B., Ehler, L. a, Mican, J. a, Baseler, M., ... Fauci, a S. (1997). Presence of an inducible HIV-1 latent reservoir during highly active antiretroviral therapy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *94*(24), 13193–7.
- Chun, T.-W., Nickle, D. C., Justement, J. S., Meyers, J. H., Roby, G., Hallahan, C. W., ... Fauci, A. S. (2008). Persistence of HIV in gut-associated lymphoid tissue despite long-term antiretroviral therapy. *The Journal of Infectious Diseases*, *197*(5), 714–20. doi:10.1086/527324
- Cocchi, F., Deico, A. L., Garzino-demo, A., Arya, S. K., Gallo, R. C. & Lussot, P. (1987). Identification of RANTES, MIP-1 alpha, and MIP-1 beta as the major HIV-suppressive factors produced by CD8+ T cells. *Science*, *270*, 1811–1815.
- Coleman, C. M. & Wu, L. (2009). HIV interactions with monocytes and dendritic cells: viral latency and reservoirs. *Retrovirology*, *6*, 51. doi:10.1186/1742-4690-6-51
- Costagliola, D. (2014). Demographics of HIV and aging. *Current Opinion in HIV and AIDS*, *9*(4), 294–301. doi:10.1097/COH.0000000000000076

- Daar, E. S., Li, X. L., Moudgil, T. & Ho, D. D. (1990). High concentrations of recombinant soluble CD4 are required to neutralize primary human immunodeficiency virus type 1 isolates. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87(17), 6574–8.
- Dai, J., Agosto, L. M., Baytop, C., Yu, J. J., Pace, M. J., Liszewski, M. K. & O'Doherty, U. (2009). Human immunodeficiency virus integrates directly into naive resting CD4+ T cells but enters naive cells less efficiently than memory cells. *Journal of Virology*, 83(9), 4528–37. doi:10.1128/JVI.01910-08
- Davenport, M. P. & Petravic, J. (2010). CD8+ T cell control of HIV a known unknown. *PLoS Pathogens*, 6(1), e1000728. doi:10.1371/journal.ppat.1000728
- Davey, R. T., Bhat, N., Yoder, C., Chun, T. W., Metcalf, J. a, Dewar, R., ... Lane, H. C. (1999). HIV-1 and T cell dynamics after interruption of highly active antiretroviral therapy (HAART) in patients with a history of sustained viral suppression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(26), 15109–14.
- Deeks, S. G., Wagner, B., Anton, P. a, Mitsuyasu, R. T., Scadden, D. T., Huang, C., ... Hege, K. M. (2002). A phase II randomized study of HIV-specific T-cell gene therapy in subjects with undetectable plasma viremia on combination antiretroviral therapy. *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy*, 5(6), 788–97. doi:10.1006/mthe.2002.0611
- Deng, H., Liu, R., Ellmeier, W. & Choe, S. (1996). Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1. *Nature*, 381, 661–666.
- Deng, Y., Wang, C. C., Choy, K. W., Du, Q., Chen, J., Wang, Q., ... Tang, T. (2014). Therapeutic potentials of gene silencing by RNA interference: principles, challenges, and new strategies. *Gene*, 538(2), 217–27. doi:10.1016/j.gene.2013.12.019
- Denton, P. W., Nochi, T., Lim, A., Krisko, J. F., Martinez-Torres, F., Choudhary, S. K., ... Garcia, J. V. (2012). IL-2 receptor gamma chain molecule is critical for intestinal T-cell reconstitution in humanized mice. *Mucosal Immunology*, 5(5), 555–66. doi:10.1038/mi.2012.31
- Descours, B., Cribier, A., Chable-Bessia, C., Ayinde, D., Rice, G., Crow, Y., ... Benkirane, M. (2012). SAMHD1 restricts HIV-1 reverse transcription in quiescent CD4(+) T-cells. *Retrovirology*, 9(1), 87. doi:10.1186/1742-4690-9-87
- Di Mascio, M., Srinivasula, S., Bhattacharjee, A., Cheng, L., Martiniova, L., Herscovitch, P., ... Kiesewetter, D. (2009). Antiretroviral tissue kinetics: in vivo imaging using positron emission tomography. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53(10), 4086–95. doi:10.1128/AAC.00419-09
- Didigu, C., Wilen, C. & Wang, J. (2014). Simultaneous zinc-finger nuclease editing of the HIV coreceptors ccr5 and cxcr4 protects CD4+ T cells from HIV-1 infection. *Blood*, 123(1), 61–9. doi:10.1182/blood-2013-08-521229
- DiGiusto, D. L., Krishnan, A., Li, L., Li, H., Li, S., Rao, A., ... Zaia, J. a. (2010). RNA-based gene therapy for HIV with lentiviral vector-modified CD34(+) cells in patients undergoing transplantation for AIDS-related lymphoma. *Science Translational Medicine*, 2(36), 1–8. doi:10.1126/scitranslmed.3000931
- Doitsh, G., Cavrois, M., Lassen, K. & Zepeda, O. (2010). Abortive HIV infection mediates CD4 T cell depletion and inflammation in human lymphoid tissue. *Cell*, 143(5), 789–801. doi:10.1016/j.cell.2010.11.001.Abortive
- Doitsh, G., Galloway, N. L. K., Geng, X., Yang, Z., Monroe, K. M., Zepeda, O., ... Greene, W. C. (2014). Cell death by pyroptosis drives CD4 T-cell depletion in HIV-1 infection. *Nature*, 505(7484), 509–14. doi:10.1038/nature12940
- Donnelly, M. L. L., Luke, G., Mehrotra, A., Li, X., Hughes, L. E., Gani, D. & Ryan, M. D. (2001). Analysis of the aphthovirus 2A/2B polyprotein “cleavage” mechanism indicates

- not a proteolytic reaction, but a novel translational effect: a putative ribosomal 'skip'. *Journal of General Virology*, 1013–1025.
- Dragic, T., Litwin, V., Allaway, G. & Martin, S. (1996). HIV-1 entry into CD4+ cells is mediated by the chemokine receptor CC-CKR-5. *Nature*, 681, 667–673.
- Dropulić, B., Hěrmánková, M. & Pitha, P. M. (1996). A conditionally replicating HIV-1 vector interferes with wild-type HIV-1 replication and spread. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(20), 11103–8.
- Dull, T., Zufferey, R., Kelly, M., Mandel, R. J., Nguyen, M., Trono, D., ... Dull, T. O. M. (1998). A Third-Generation Lentivirus Vector with a Conditional Packaging System. *Journal of Virology*, 72(11).
- Dupuy, F. P., Mouly, E., Mesel-Lemoine, M., Morel, C., Abriol, J., Cherai, M., ... Lemoine, F. M. (2005). Lentiviral transduction of human hematopoietic cells by HIV-1- and SIV-based vectors containing a bicistronic cassette driven by various internal promoters. *The Journal of Gene Medicine*, 7(9), 1158–71. doi:10.1002/jgm.769
- Egelhofer, M., Brandenburg, G., Martinus, H., Schult-dietrich, P., Melikyan, G., Kunert, R., ... Laer, D. Von. (2004). Inhibition of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Entry in Cells Expressing. *Journal of Virology*, 78(2), 568–575. doi:10.1128/JVI.78.2.568
- Egerer, L., Volk, A., Kahle, J., Kimpel, J., Brauer, F., Hermann, F. G. & von Laer, D. (2011). Secreted antiviral entry inhibitory (SAVE) peptides for gene therapy of HIV infection. *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy*, 19(7), 1236–44. doi:10.1038/mt.2011.30
- Emamzadeh-Fard, S., Fard, S. E., SeyedAlinaghi, S. & Paydary, K. (2012). Adherence to anti-retroviral therapy and its determinants in HIV/AIDS patients: a review. *Infectious Disorders Drug Targets*, 12(5), 346–56.
- Engelman, a, Mizuuchi, K. & Craigie, R. (1991). HIV-1 DNA integration: mechanism of viral DNA cleavage and DNA strand transfer. *Cell*, 67(6), 1211–21.
- Excler, J.-L., Tomaras, G. D. & Russell, N. D. (2013). Novel directions in HIV-1 vaccines revealed from clinical trials. *Current Opinion in HIV and AIDS*, 8(5), 421–31. doi:10.1097/COH.0b013e3283632c26
- Felber, B. K., Drysdale, C. M. & Pavlakis, G. N. (1990). Feedback regulation of human immunodeficiency virus type 1 expression by the Rev protein. *Journal of Virology*, 64(8), 3734–41.
- Feng, Y., Broder, C. C., Kennedy, P. E. & Berger, E. a. (1996). HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor. *Science*, 272(5263), 872–7.
- Finkel, T., Tudor-Williams, G. & Banda, N. (1995). Apoptosis occurs predominantly in bystander cells and not in productively infected cells of HIV-and SIV-infected lymph nodes. *Nature Medicine*, 1(2), 129–134.
- Finkelshtein, D., Werman, A., Novick, D., Barak, S. & Rubinstein, M. (2013). LDL receptor and its family members serve as the cellular receptors for vesicular stomatitis virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(18), 7306–11. doi:10.1073/pnas.1214441110
- Forssmann, W.-G., The, Y.-H., Stoll, M., Adermann, K., Albrecht, U., Tillmann, H.-C., ... Schmidt, R. E. (2010). Short-term monotherapy in HIV-infected patients with a virus entry inhibitor against the gp41 fusion peptide. *Science Translational Medicine*, 2(63), 1–7. doi:10.1126/scitranslmed.3001697
- Gao, F., Bailes, E., Robertson, D. L., Chen, Y., Rodenburg, C. M., Michael, S. F., ... Hahn, B. H. (1999). Origin of HIV-1 in the chimpanzee *Pan troglodytes troglodytes*. *Nature*, 397(6718), 436–41. doi:10.1038/17130
- Gaspar, H. B., Cooray, S., Gilmour, K. C., Parsley, K. L., Zhang, F., Adams, S., ... Thrasher, A. J. (2011). Hematopoietic stem cell gene therapy for adenosine deaminase-deficient

- severe combined immunodeficiency leads to long-term immunological recovery and metabolic correction. *Science Translational Medicine*, 3(97), 1–9. doi:10.1126/scitranslmed.3002716
- Gaufin, T., Ribeiro, R., Gautam, R. & Dufour, J. (2010). Research Experimental depletion of CD8+ cells in acutely SIVagm-Infected African Green Monkeys results in increased viral replication. *Retrovirology*, 1–13.
- Gayle C. Bosma; R. Philip Custer; Melvin J. Bosma. (1983). A severe combined immunodeficiency mutation in the mouse. *Nature*, 301, 527–530.
- Gilbert, P., Wang, M., Wrin, T., Petropoulos, C., Gurwith, M., Sinangil, F., ... Montefiori, D. C. (2010). Magnitude and breadth of a nonprotective neutralizing antibody response in an efficacy trial of a candidate HIV-1 gp120 vaccine. *The Journal of Infectious Diseases*, 202(4), 595–605. doi:10.1086/654816
- Ginn, S. L., Alexander, I. E. & Edelstein, M. L. (2013). Gene therapy clinical trials worldwide to 2012 – an update. *The Journal of Gene Medicine*, 65–77. doi:10.1002/jgm
- Glushakova, S. & Baibakov, B. (1995). Infection of human tonsil histocultures: a model for HIV pathogenesis. *Nature Medicine*, 1, 1320–1322.
- Goffinet, C., Michel, N., Allespach, I., Tervo, H.-M., Hermann, V., Kräusslich, H.-G., ... Keppler, O. T. (2007). Primary T-cells from human CD4/CCR5-transgenic rats support all early steps of HIV-1 replication including integration, but display impaired viral gene expression. *Retrovirology*, 4, 53. doi:10.1186/1742-4690-4-53
- Gorantla, S., Makarov, E., Finke-Dwyer, J., Gebhart, C. L., Domm, W., Dewhurst, S., ... Poluektova, L. Y. (2010). CD8+ cell depletion accelerates HIV-1 immunopathology in humanized mice. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 184(12), 7082–7091. doi:10.4049/jimmunol.1000438
- Gorochov, G., Neumann, A. & Kereveur, A. (1998). Perturbation of CD4+ and CD8+ T-cell repertoires during progression to AIDS and regulation of the CD4+ repertoire during antiviral therapy. *Nature Medicine*, 4, 215–221.
- Gougeon, M.-L. (2005). To kill or be killed: how HIV exhausts the immune system. *Cell Death and Differentiation*, 12, 845–54. doi:10.1038/sj.cdd.4401616
- Gram, G. J., Nielsen, S. D. & Hansen, J. E. (1998). Spontaneous silencing of humanized green fluorescent protein (hGFP) gene expression from a retroviral vector by DNA methylation. *Journal of Hematotherapy*, 7, 333–341. doi:10.1089/scd.1.1998.7.333
- Granelli-Piperno, a, Delgado, E., Finkel, V., Paxton, W. & Steinman, R. M. (1998). Immature dendritic cells selectively replicate macrophagetropic (M-tropic) human immunodeficiency virus type 1, while mature cells efficiently transmit both M- and T-tropic virus to T cells. *Journal of Virology*, 72(4), 2733–7.
- Gray, G. E., Allen, M., Moodie, Z., Churchyard, G., Bekker, L.-G., Nchabeleng, M., ... Kublin, J. G. (2011). Safety and efficacy of the HVTN 503/Phambili study of a clade-B-based HIV-1 vaccine in South Africa: a double-blind, randomised, placebo-controlled test-of-concept phase 2b study. *The Lancet Infectious Diseases*, 11(7), 507–15. doi:10.1016/S1473-3099(11)70098-6
- Greenblatt, M. B., Vrbanc, V., Vrbanc, V., Tivey, T., Tsang, K., Tager, A. M. & Aliprantis, A. O. (2012). Graft versus host disease in the bone marrow, liver and thymus humanized mouse model. *PloS One*, 7(9), 1–9. doi:10.1371/journal.pone.0044664
- Gu, Y., Hou, W., Xu, C., Li, S., Shih, J. W. K. & Xia, N. (2012). The enhancement of RNAi against HIV in vitro and in vivo using H-2K(k) protein as a sorting method. *Journal of Virological Methods*, 182(1-2), 9–17. doi:10.1016/j.jviromet.2012.02.007
- Guadalupe, M., Reay, E. & Sankaran, S. (2003). depletion in gut lymphoid tissue during primary human immunodeficiency virus type 1 infection and substantial delay in restoration following highly active antiretroviral. *Journal of Virology*, 77(21), 11708–11717. doi:10.1128/JVI.77.21.11708

- Gulick, R. & Lalezari, J. (2008). Maraviroc for previously treated patients with R5 HIV-1 infection. *The New England Journal of Medicine*, 359(14), 1429–1441.
- Gurunathan, S., Habib, R. El, Baglyos, L., Meric, C., Plotkin, S., Dodet, B., ... Tartaglia, J. (2009). Use of predictive markers of HIV disease progression in vaccine trials. *Vaccine*, 27(14), 1997–2015. doi:10.1016/j.vaccine.2009.01.039
- Haase, A. T. (2005). Perils at mucosal front lines for HIV and SIV and their hosts. *Nature Reviews Immunology*, 5(10), 783–792. doi:10.1038/nri1706
- Hacein-Bey-Abina, S., Hauer, J., Lim, A., Picard, C., Wang, G. P., Berry, C. C., ... Cavazzana-Calvo, M. (2010). Efficacy of gene therapy for X-linked severe combined immunodeficiency. *The New England Journal of Medicine*, 363(4), 355–64. doi:10.1056/NEJMoa1000164
- Hahn, B., Shaw, G., De Cock, K. & Sharp, P. (2000). AIDS as a Zoonosis: Scientific and Public Health Implications. *Science*, 287(5453), 607–614. doi:10.1126/science.287.5453.607
- Hammer, S. M., Sobieszczyk, M. E., Janes, H., Karuna, S. T., Mulligan, M. J., Grove, D., ... Gilbert, P. B. (2013). Efficacy trial of a DNA/rAd5 HIV-1 preventive vaccine. *The New England Journal of Medicine*, 369(22), 2083–92. doi:10.1056/NEJMoa1310566
- Hartley, O., Dorgham, K. & Perez-Bercoff, D. (2003). Human immunodeficiency virus type 1 entry inhibitors selected on living cells from a library of phage chemokines. *Journal of Virology*, 77(12), 6637–6644. doi:10.1128/JVI.77.12.6637
- Hatzioannou, T., Del Prete, G. Q., Keele, B. F., Estes, J. D., McNatt, M. W., Bitzegeio, J., ... Bieniasz, P. D. (2014). HIV-1-induced AIDS in monkeys. *Science*, 344(6190), 1401–1405. doi:10.1126/science.1250761
- Hauber, I., Hofmann-Sieber, H., Chemnitz, J., Dubrau, D., Chusainow, J., Stucka, R., ... Hauber, J. (2013). Highly significant antiviral activity of HIV-1 LTR-specific tre-recombinase in humanized mice. *PLoS Pathogens*, 9(9), 1–20. doi:10.1371/journal.ppat.1003587
- Hawkins, T. (2010). Understanding and managing the adverse effects of antiretroviral therapy. *Antiviral Research*, 85(1), 201–9. doi:10.1016/j.antiviral.2009.10.016
- Hayakawa, J., Washington, K., Uchida, N., Phang, O., Kang, E. M., Hsieh, M. M. & Tisdale, J. F. (2009). Long-term vector integration site analysis following retroviral mediated gene transfer to hematopoietic stem cells for the treatment of HIV infection. *PloS One*, 4(1), 1–6. doi:10.1371/journal.pone.0004211
- Haynes, B. & Gilbert, P. (2012). Immune-correlates analysis of an HIV-1 vaccine efficacy trial. *The New England Journal of Medicine*, 366(14), 1275–1286.
- Heredia, A., Gilliam, B., DeVico, A., Le, N., Bamba, D., Flinko, R., ... Redfield, R. R. (2007). CCR5 density levels on primary CD4 T cells impact the replication and Enfuvirtide susceptibility of R5 HIV-1. *AIDS*, 21, 1317–1322. doi:10.1097/QAD.0b013e32815278ea
- Ho, D., Neumann, A. & Perelson, A. (1995). Rapid turnover of plasma virions and CD4 lymphocytes in HIV-1 infection. *Nature*, 373, 123–126.
- Hofer, U., Henley, J. E., Exline, C. M., Mulhern, O., Lopez, E. & Cannon, P. M. (2013). Pre-clinical modeling of CCR5 knockout in human hematopoietic stem cells by zinc finger nucleases using humanized mice. *The Journal of Infectious Diseases*, 208 Suppl , S160–4. doi:10.1093/infdis/jit382
- Holt, N., Wang, J., Kim, K. & Friedman, G. (2010). Human hematopoietic stem/progenitor cells modified by zinc-finger nucleases targeted to CCR5 control HIV-1 in vivo. *Nature Biotechnology*, 28(8), 839–847. doi:10.1038/nbt.1663
- Hrecka, K., Hao, C., Gierszewska, M., Swanson, S. K., Kesik-Brodacka, M., Srivastava, S., ... Skowronski, J. (2011). Vpx relieves inhibition of HIV-1 infection of macrophages mediated by the SAMHD1 protein. *Nature*, 474, 658–661. doi:10.1038/nature10195

- Hütter, G. & Nowak, D. (2009). Long-term control of HIV by CCR5 Delta32/Delta32 stem-cell transplantation. *The New England Journal of Medicine*, 360(7), 692–698.
- Humeau, L. M., Binder, G. K., Lu, X., Slepishkin, V., Merling, R., Echeagaray, P., ... Dropulic, B. (2004). Efficient lentiviral vector-mediated control of HIV-1 replication in CD4 lymphocytes from diverse HIV+ infected patients grouped according to CD4 count and viral load. *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy*, 9(6), 902–13. doi:10.1016/j.yymthe.2004.03.005
- Imamichi, H., Degray, G., Dewar, R. L., Mannon, P., Yao, M., Chairez, C., ... Kovacs, J. a. (2011). Lack of compartmentalization of HIV-1 quasispecies between the gut and peripheral blood compartments. *The Journal of Infectious Diseases*, 204(2), 309–14. doi:10.1093/infdis/jir259
- Imler, J. L. (1995). Adenovirus vectors as recombinant viral vaccines. *Vaccine*, 13(13), 1143–51.
- Ince, W. L., Zhang, L., Jiang, Q., Arrildt, K., Su, L. & Swanstrom, R. (2010). Evolution of the HIV-1 env gene in the Rag2-/- gammaC-/- humanized mouse model. *Journal of Virology*, 84(6), 2740–52. doi:10.1128/JVI.02180-09
- Ito, M., Hiramatsu, H. & Kobayashi, K. (2002). NOD/SCID/ γ mouse: an excellent recipient mouse model for engraftment of human cells. *Blood*, 100(9), 3175–3182. doi:10.1182/blood-2001-12-0207.Supported
- Jacquelin, B., Mayau, V., Brysbaert, G., Regnault, B., Diop, O. M., Arenzana-Seisdedos, F., ... Müller-Trutwin, M. C. (2007). Long oligonucleotide microarrays for African green monkey gene expression profile analysis. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 21(12), 3262–71. doi:10.1096/fj.07-8271com
- Jenkins, Y., McEntee, M., Weis, K. & Greene, W. C. (1998). Characterization of HIV-1 vpr nuclear import: analysis of signals and pathways. *The Journal of Cell Biology*, 143(4), 875–85.
- Jin, X., Bauer, D. & Tuttleton, S. (1999). Dramatic rise in plasma viremia after CD8+ T cell depletion in simian immunodeficiency virus-infected macaques. *The Journal of Experimental Medicine*, 189(6), 991–996.
- Joseph, A., Zheng, J. H., Chen, K., Dutta, M., Chen, C., Stiegler, G., ... Goldstein, H. (2010). Inhibition of in vivo HIV infection in humanized mice by gene therapy of human hematopoietic stem cells with a lentiviral vector encoding a broadly neutralizing anti-HIV antibody. *Journal of Virology*, 84(13), 6645–53. doi:10.1128/JVI.02339-09
- Joseph, A., Zheng, J. H., Follenzi, A., Diloranzo, T., Sango, K., Hyman, J., ... Goldstein, H. (2008). Lentiviral vectors encoding human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-specific T-cell receptor genes efficiently convert peripheral blood CD8 T lymphocytes into cytotoxic T lymphocytes with potent in vitro and in vivo HIV-1-specific inhibitory activity. *Journal of Virology*, 82(6), 3078–89. doi:10.1128/JVI.01812-07
- Kang, E. & Witte, M. De. (2002). Nonmyeloablative conditioning followed by transplantation of genetically modified HLA-matched peripheral blood progenitor cells for hematologic malignancies in. *Blood*, 99(2), 698–701.
- Kay, M., Glorioso, J. & Naldini, L. (2001). Viral vectors for gene therapy: the art of turning infectious agents into vehicles of therapeutics. *Nature Medicine*, 7(1), 33–40.
- Kiem, H., Jerome, K. R., Deeks, S. G. & McCune, J. M. (2012). Review Hematopoietic-Stem-Cell-Based Gene Therapy for HIV Disease. *Stem Cell*, 10(2), 137–147. doi:10.1016/j.stem.2011.12.015
- Kiem, H.-P., Wu, R. a, Sun, G., von Laer, D., Rossi, J. J. & Trobridge, G. D. (2010). Foamy combinatorial anti-HIV vectors with MGMTP140K potently inhibit HIV-1 and SHIV replication and mediate selection in vivo. *Gene Therapy*, 17(1), 37–49. doi:10.1038/gt.2009.118

- Kilby, J., Hopkins, S. & Venetta, T. (1998). Potent suppression of HIV-1 replication in humans by T-20, a peptide inhibitor of gp41-mediated virus entry. *Nature Medicine*, 4(11), 24–26.
- Kim, S.-S., Peer, D., Kumar, P., Subramanya, S., Wu, H., Asthana, D., ... Shankar, P. (2010). RNAi-mediated CCR5 silencing by LFA-1-targeted nanoparticles prevents HIV infection in BLT mice. *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy*, 18(2), 370–6. doi:10.1038/mt.2009.271
- Kimpel, J., Braun, S., Qiu, G. & Wong, F. (2010). Survival of the fittest: positive selection of CD4+ T cells expressing a membrane-bound fusion inhibitor following HIV-1 infection. *PLoS One*, 5(8), 1–11. doi:10.1371/journal.pone.0012357
- King, M. a, Covassin, L., Brehm, M. a, Racki, W., Pearson, T., Leif, J., ... Greiner, D. L. (2009). Human peripheral blood leucocyte non-obese diabetic-severe combined immunodeficiency interleukin-2 receptor gamma chain gene mouse model of xenogeneic graft-versus-host-like disease and the role of host major histocompatibility complex. *Clinical and Experimental Immunology*, 157(1), 104–18. doi:10.1111/j.1365-2249.2009.03933.x
- Kitchen, S. G., Bennett, M., Galić, Z., Kim, J., Xu, Q., Young, A., ... Zack, J. a. (2009). Engineering antigen-specific T cells from genetically modified human hematopoietic stem cells in immunodeficient mice. *PloS One*, 4(12), 1–9. doi:10.1371/journal.pone.0008208
- Kitchen, S. G., Levin, B. R., Bristol, G., Rezek, V., Kim, S., Aguilera-Sandoval, C., ... Zack, J. a. (2012). In vivo suppression of HIV by antigen specific T cells derived from engineered hematopoietic stem cells. *PLoS Pathogens*, 8(4), 1–13. doi:10.1371/journal.ppat.1002649
- Klatzmann, D., Champagne, E. & Chamaret, S. (1984). T-lymphocyte T4 molecule behaves as the receptor for human retrovirus LAV. *Nature*, 312, 767–768.
- Kohn, D. B., Bauer, G., Rice, C. R., Rothschild, J. C., Carbonaro, D. a, Valdez, P., ... Church, J. (1999). A clinical trial of retroviral-mediated transfer of a rev-responsive element decoy gene into CD34(+) cells from the bone marrow of human immunodeficiency virus-1-infected children. *Blood*, 94(1), 368–71.
- Koup, R., Safrit, J. & Cao, Y. (1994). Temporal association of cellular immune responses with the initial control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 syndrome. *Journal of Virology*, 68, 4650–4655.
- Kumar, A., Abbas, W. & Herbein, G. (2014). HIV-1 latency in monocytes/macrophages. *Viruses*, 6(4), 1837–60. doi:10.3390/v6041837
- Kumar, P., Ban, H., Kim, S. & Wu, H. (2008). T cell-specific siRNA delivery suppresses HIV-1 infection in humanized mice. *Cell*, 577–586. doi:10.1016/j.cell.2008.06.034
- Kuwata, T., Igarashi, T., Ido, E., Jin, M., Mizuno, a, Chen, J. & Hayami, M. (1995). Construction of human immunodeficiency virus 1/simian immunodeficiency virus strain mac chimeric viruses having vpr and/or nef of different parental origins and their in vitro and in vivo replication. *The Journal of General Virology*, 76 (Pt 9), 2181–91.
- Kwant-Mitchell, A., Pek, E. a, Rosenthal, K. L. & Ashkar, A. a. (2009). Development of functional human NK cells in an immunodeficient mouse model with the ability to provide protection against tumor challenge. *PloS One*, 4(12), e8379. doi:10.1371/journal.pone.0008379
- Kwon, D. S., Gregorio, G., Bitton, N., Hendrickson, W. a & Littman, D. R. (2002). DC-SIGN-mediated internalization of HIV is required for trans-enhancement of T cell infection. *Immunity*, 16(1), 135–44.
- Lan, P., Tonomura, N., Shimizu, A., Wang, S. & Yang, Y.-G. (2006). Reconstitution of a functional human immune system in immunodeficient mice through combined human

- fetal thymus/liver and CD34+ cell transplantation. *Blood*, 108(2), 487–92. doi:10.1182/blood-2005-11-4388
- Laspia, M. F., Rice, a P. & Mathews, M. B. (1989). HIV-1 Tat protein increases transcriptional initiation and stabilizes elongation. *Cell*, 59(2), 283–92.
- Lavender, K. J., Pang, W. W., Messer, R. J., Duley, A. K., Race, B., Phillips, K., ... Hasenkrug, K. J. (2013). BLT-humanized C57BL/6 Rag2-/- γ c-/-CD47-/- mice are resistant to GVHD and develop B- and T-cell immunity to HIV infection. *Blood*, 122(25), 4013–20. doi:10.1182/blood-2013-06-506949
- Le Grice, S. F. J. (2012). Human immunodeficiency virus reverse transcriptase: 25 years of research, drug discovery, and promise. *The Journal of Biological Chemistry*, 287(49), 40850–7. doi:10.1074/jbc.R112.389056
- Lee, S. ., Gallardo, H. ., Gilboa, E. & Smith, C. (1994). Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 in human T cells by a potent Rev 13-nucleotide minimal Rev-binding domain . *J Virol*.
- Legrand, N., Huntington, N. D., Nagasawa, M., Bakker, A. Q. & Schotte, R. (2011). Functional CD47 / signal regulatory protein alpha (SIRP α) interaction is required for optimal human T- and natural killer- (NK) cell homeostasis in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108, 13224–13229. doi:10.1073/pnas.1101398108/- /DCSupplemental.www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1101398108
- Lelièvre, J., Petit, F. & Arnoult, D. (2005). Interleukin 7 increases human immunodeficiency virus type 1 LAI-mediated Fas-induced T-cell death. *Journal of Virology*, 79, 3195–3199. doi:10.1128/JVI.79.5.3195
- Leuci, V., Mesiano, G., Gammaitoni, L., Cammarata, C., Capellero, S., Todorovic, M., ... Sangiolo, D. (2011). Transient proteasome inhibition as a strategy to enhance lentiviral transduction of hematopoietic CD34(+) cells and T lymphocytes: implications for the use of low viral doses and large-size vectors. *Journal of Biotechnology*, 156(3), 218–26. doi:10.1016/j.jbiotec.2011.09.001
- Levine, B. L., Bernstein, W. B., Connors, M., Craighead, N., Lindsten, T., Thompson, C. B. & June, C. H. (1997). Effects of CD28 costimulation on long-term proliferation of CD4+ T cells in the absence of exogenous feeder cells. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 159(12), 5921–30.
- Levine, B. L., Humeau, L. M., Boyer, J., MacGregor, R.-R., Rebello, T., Lu, X., ... June, C. H. (2006). Gene transfer in humans using a conditionally replicating lentiviral vector. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(46), 17372–7. doi:10.1073/pnas.0608138103
- Lewis, A. D., Chen, R., Montefiori, D. C., Philip, R., Clark, K. R. & Johnson, P. R. (2002). Generation of Neutralizing Activity against Human Immunodeficiency Virus Type 1 in Serum by Antibody Gene Transfer. *Journal of Virology*. doi:10.1128/JVI.76.17.8769
- Lewis, P. F. & Emerman, M. (1994). Passage through mitosis is required for oncoretroviruses but not for the human. *Journal of Virology*, 68(1).
- Li, L., Qiu, C., Li, L. Z., Liu, A. P., Zhou, M. Z., Han, Z. M., ... Zhu, H. Z. (2012). In Vitro Infection of Human Umbilical Cord Blood CD34(+) Hematopoietic Progenitor Cells by HIV-1 CRF07_BC Enveloped Pseudovirus. *Current Hiv Research*, 10, 572–577.
- Li, M. (2003). Inhibition of HIV-1 infection by lentiviral vectors expressing pol III-promoted anti-HIV RNAs. *Molecular Therapy*, 8(2), 196–206. doi:10.1016/S1525-0016(03)00165-5
- Li, Q., Duan, L., Estes, J., Ma, Z. & Rourke, T. (2005). Peak SIV replication in resting memory CD4 + T cells depletes gut lamina propria CD4+ T cells. *Nature*, 434(APRIL). doi:10.1038/nature03546.Published

- Liebert, M. A., Movassagh, M., Boyer, O., Burland, M., Leclercq, V., Klatzmann, D. & Lemoine, F. M. (2000). Retrovirus-Mediated Gene Transfer into T Cells : 95 % without further in vitro selection. *Human Gene T*, 1200, 1189–1200.
- Lim, J. K., Glass, W. G., McDermott, D. H. & Murphy, P. M. (2006). CCR5: no longer a “good for nothing” gene--chemokine control of West Nile virus infection. *Trends in Immunology*, 27(7), 308–12. doi:10.1016/j.it.2006.05.007
- Lim, J. K., McDermott, D. H., Lisco, A., Foster, G. a, Krysztof, D., Follmann, D., ... Murphy, P. M. (2010). CCR5 deficiency is a risk factor for early clinical manifestations of West Nile virus infection but not for viral transmission. *The Journal of Infectious Diseases*, 201(2), 178–85. doi:10.1086/649426
- Linial, M. L. (1999). Retroviruses MINIREVIEW Foamy Viruses Are Unconventional Retroviruses, 73(3).
- Liu, R., Paxton, W., Choe, S. & Ceradini, D. (1996). Homozygous defect in HIV-1 coreceptor accounts for resistance of some multiply-exposed individuals to HIV-1 infection. *Cell*, 86, 367–377.
- Llano, M., Saenz, D. T., Meehan, A., Wongthida, P., Peretz, M., Walker, W. H., ... Poeschla, E. M. (2006). An essential role for LEDGF/p75 in HIV integration. *Science (New York, N.Y.)*, 314(5798), 461–4. doi:10.1126/science.1132319
- Lu, J., Deeks, S. G., Hoh, R., Beatty, G., Kuritzkes, B. a, Martin, J. N. & Kuritzkes, D. R. (2006). Rapid emergence of enfuvirtide resistance in HIV-1-infected patients: results of a clonal analysis. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes (1999)*, 43(1), 60–4. doi:10.1097/01.qai.0000234083.34161.55
- Lu, J., Sista, P., Giguel, F., Kuritzkes, D. R. & Greenberg, M. (2004). Relative Replicative Fitness of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Mutants Resistant to Enfuvirtide (T-20). *Journal of Virology*, 78, 4628–4637. doi:10.1128/JVI.78.9.4628
- Lunzen, J. Van & Glaunsinger, T. (2007). Transfer of autologous gene-modified T cells in HIV-infected patients with advanced immunodeficiency and drug-resistant virus. *Molecular*, 15(5), 1024–1033. doi:10.1038/mt.sj.6300124
- MacLaren, R. E., Groppe, M., Barnard, A. R., Cottrill, C. L., Tolmachova, T., Seymour, L., ... Seabra, M. C. (2014). Retinal gene therapy in patients with choroideremia: initial findings from a phase 1/2 clinical trial. *Lancet*, 383(9923), 1129–37. doi:10.1016/S0140-6736(13)62117-0
- Macpherson, J. L., Boyd, M. P., Arndt, A. J., Todd, A. V, Fanning, G. C., Ely, J. a, ... Cooper, D. a. (2005). Long-term survival and concomitant gene expression of ribozyme-transduced CD4+ T-lymphocytes in HIV-infected patients. *The Journal of Gene Medicine*, 7(5), 552–64. doi:10.1002/jgm.705
- Maier, D. a, Brennan, A. L., Jiang, S., Binder-Scholl, G. K., Lee, G., Plesa, G., ... Levine, B. L. (2013). Efficient clinical scale gene modification via zinc finger nuclease-targeted disruption of the HIV co-receptor CCR5. *Human Gene Therapy*, 24(3), 245–58. doi:10.1089/hum.2012.172
- Malim, M. H., Böhnlein, S., Hauber, J. & Cullen, B. R. (1989). Functional dissection of the HIV-1 Rev trans-activator--derivation of a trans-dominant repressor of Rev function. *Cell*, 58(1), 205–14.
- Mansky, L. M. & Temin, H. M. (1995). Lower in vivo mutation rate of human immunodeficiency virus type 1 than that predicted from the fidelity of purified reverse Lower. *Journal of Virology*, 69, 5087–594.
- Marjorie A. Oettinger, David G. Schatz, Carolyn Gorka, D. B. (1990). RAG-I1 and RAG-2, Adjacent Genes That Synergistically Activate V(D)J Recombination.
- Marodon, G., Desjardins, D., Mercey, L., Baillou, C., Parent, P., Manuel, M., ... Klatzmann, D. (2009). High diversity of the immune repertoire in humanized NOD . SCID . c c À / À mice. *European Journal of Immunology*, 39, 2136–2145. doi:10.1002/eji.200939480

- Marodon, G. & Fisson, S. (2006). Induction of antigen-specific tolerance by intrathymic injection of lentiviral vectors. *Blood*, *108*(9), 2972–2978. doi:10.1182/blood-2006-03-010900.Supported
- Marques, R. E., Guabiraba, R., Russo, R. C. & Teixeira, M. M. (2013). Targeting CCL5 in inflammation. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, *17*(12), 1439–60. doi:10.1517/14728222.2013.837886
- Matsui, M., Weaver, J., Proudfoot, A. E. I., Wujek, J. R., Wei, T., Richer, E., ... Ransohoff, R. M. (2002). Treatment of experimental autoimmune encephalomyelitis with the chemokine receptor antagonist Met-RANTES. *Journal of Neuroimmunology*, *128*(1-2), 16–22.
- Mbisa, J. L., Barr, R., Thomas, J. A., Vandegraaff, N., Dorweiler, I. J., Svarovskaia, E. S., ... Pathak, V. K. (2007). Human immunodeficiency virus type 1 cDNAs produced in the presence of APOBEC3G exhibit defects in plus-strand DNA transfer and integration. *Journal of Virology*, *81*, 7099–7110. doi:10.1128/JVI.00272-07
- Mbonye, U. & Karn, J. (2014). Transcriptional control of HIV latency: cellular signaling pathways, epigenetics, happenstance and the hope for a cure. *Virology*, *454-455*, 328–39. doi:10.1016/j.virol.2014.02.008
- McCarty, D. M., Young, S. M. & Samulski, R. J. (2004). Integration of adeno-associated virus (AAV) and recombinant AAV vectors. *Annual Review of Genetics*, *38*, 819–45. doi:10.1146/annurev.genet.37.110801.143717
- McCune, J. M., Namikawa, R., Kaneshima, H., Shultz, L. D., Lieberman, M. & Weissman, I. L. (1988). The SCID-hu mouse: murine model for the analysis of human hematolymphoid differentiation and function. *Science (New York, N.Y.)*, *241*(4873), 1632–9.
- McDonald, D., Vodicka, M. a, Lucero, G., Svitkina, T. M., Borisy, G. G., Emerman, M. & Hope, T. J. (2002). Visualization of the intracellular behavior of HIV in living cells. *The Journal of Cell Biology*, *159*(3), 441–52. doi:10.1083/jcb.200203150
- McGarrity, G. & Hoyah, G. (2013). Patient monitoring and follow-up in lentiviral clinical trials. *The Journal of Gene ...*, (July 2012), 78–82. doi:10.1002/jgm
- Mehandru, S., Poles, M. a, Tenner-Racz, K., Horowitz, A., Hurley, A., Hogan, C., ... Markowitz, M. (2004). Primary HIV-1 infection is associated with preferential depletion of CD4+ T lymphocytes from effector sites in the gastrointestinal tract. *The Journal of Experimental Medicine*, *200*(6), 761–70. doi:10.1084/jem.20041196
- Melkus, M. W., Estes, J. D., Padgett-Thomas, A., Gatlin, J., Denton, P. W., Othieno, F. a, ... Garcia, J. V. (2006). Humanized mice mount specific adaptive and innate immune responses to EBV and TSST-1. *Nature Medicine*, *12*(11), 1316–22. doi:10.1038/nm1431
- Meng, G., Wei, X., Wu, X., Sellers, M. T., Decker, J. M., Moldoveanu, Z., ... Smith, P. D. (2002). Primary intestinal epithelial cells selectively transfer R5 HIV-1 to CCR5+ cells. *Nature Medicine*, *8*(2), 150–6. doi:10.1038/nm0202-150
- Merten, O.-W., Charrier, S., Laroudie, N., Fauchille, S., Dugué, C., Jenny, C., ... Galy, A. (2011). Large-scale manufacture and characterization of a lentiviral vector produced for clinical ex vivo gene therapy application. *Human Gene Therapy*, *22*(3), 343–56. doi:10.1089/hum.2010.060
- Miguel A.Martinez, Arantxa Gutierrez, Mercedes Armand-Ugon, Julia Blanco, Mariona Parera, Jordi Gomez, B. C. and & A.Este, J. (2003). Suppression of chemokine receptor expression by RNA interference allows for inhibition of HIV-1 replication, by Martínez et al. *AIDS (London, England)*, *17 Suppl 4*(August), S103–5.
- Mitsuyasu, R., Merigan, T. & Carr, A. (2009). Phase 2 gene therapy trial of an anti-HIV ribozyme in autologous CD34+ cells. *Nature Medicine*, *15*(3), 285–292. doi:10.1038/nm.1932

- Miura, Y. & Koyanagi, Y. (2005). Death ligand-mediated apoptosis in HIV infection. *Reviews in Medical Virology*, 15(3), 169–78. doi:10.1002/rmv.462
- Miyoshi, H., Blömer, U., Takahashi, M., Gage, H., Verma, I. M. & Gage, F. H. (1998). Development of a Self-Inactivating Lentivirus Vector. *Journal of Virology*, 72(10).
- Morgan, C., Marthas, M., Miller, C., Duerr, A., Cheng-Mayer, C., Desrosiers, R., ... Corey, L. (2008). The use of nonhuman primate models in HIV vaccine development. *PLoS Medicine*, 5(8), e173. doi:10.1371/journal.pmed.0050173
- Morlat P. CNS et ANRS. (2013). *Prise en charge médicale des personnes vivant avec le VIH*.
- Mosier, D., Gulizia, R., Baird, S. & Wilson, D. (1988). Transfer of a functional human immune system to mice with severe combined immunodeficiency. *Nature*, 335, 256–259.
- Mosier, D., Gulizia, R., Baird, S., Wilson, D., Spector, D. & Spector, S. (1990). Human Immunodeficiency Virus Infection of Human-PBL-SCID mice. *Science*, (46), 6–9.
- Münch, J., Ständer, L., Adermann, K., Schulz, A., Schindler, M., Chinnadurai, R., ... Kirchhoff, F. (2007). Discovery and optimization of a natural HIV-1 entry inhibitor targeting the gp41 fusion peptide. *Cell*, 129(2), 263–75. doi:10.1016/j.cell.2007.02.042
- Murooka, T. T., Deruaz, M., Marangoni, F., Vrbanac, V. D., Seung, E., von Andrian, U. H., ... Mempel, T. R. (2012). HIV-infected T cells are migratory vehicles for viral dissemination. *Nature*, 490(7419), 283–7. doi:10.1038/nature11398
- Naif, H. M. (2013). Pathogenesis of HIV Infection. *Infectious Disease Reports*, 5(Suppl 1), e6. doi:10.4081/idr.2013.s1.e6
- Naldini, L., Blömer, U., Gallay, P., Ory, D., Mulligan, R., Gage, F. H., ... Trono, D. (1996). In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science (New York, N.Y.)*, 272(5259), 263–7.
- Neil, S. J. D., Zang, T. & Bieniasz, P. D. (2008). Tetherin inhibits retrovirus release and is antagonized by HIV-1 Vpu. *Nature*, 451, 425–430. doi:10.1038/nature06553
- O'Brien, K. L., Liu, J., King, S. L., Sun, Y.-H., Schmitz, J. E., Lifton, M. a, ... Barouch, D. H. (2009). Adenovirus-specific immunity after immunization with an Ad5 HIV-1 vaccine candidate in humans. *Nature Medicine*, 15(8), 873–5. doi:10.1038/nm.1991
- Ohbo, K., Suda, T., Hashiyama, M., Mantani, a, Ikebe, M., Miyakawa, K., ... Sugamura, K. (1996). Modulation of hematopoiesis in mice with a truncated mutant of the interleukin-2 receptor gamma chain. *Blood*, 87(3), 956–67.
- Ojwang, J. O., Hampel, a, Looney, D. J., Wong-Staal, F. & Rappaport, J. (1992). Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 expression by a hairpin ribozyme. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(22), 10802–6.
- Oldenborg, P. -a. (2000). Role of CD47 as a Marker of Self on Red Blood Cells. *Science*, 288(5473), 2051–2054. doi:10.1126/science.288.5473.2051
- Olszko, M. E. & Trobridge, G. D. (2013). Foamy virus vectors for HIV gene therapy. *Viruses*, 5(10), 2585–600. doi:10.3390/v5102585
- Palmer, D. & Ng, P. (2005). Helper-dependent adenoviral vectors for gene therapy. *Human Gene Therapy*, 16(January), 1–16.
- Pan, T., Wu, S., He, X., Luo, H., Zhang, Y., Fan, M., ... Zhang, H. (2014). Necroptosis Takes Place in Human Immunodeficiency Virus Type-1 (HIV-1)-Infected CD4+ T Lymphocytes. *PLoS One*, 9(4), e93944. doi:10.1371/journal.pone.0093944
- Pattanayak, V., Ramirez, C. L., Joung, J. K. & Liu, D. R. (2011). Revealing off-target cleavage specificities of zinc-finger nucleases by in vitro selection. *Nature Methods*, 8(9), 765–70. doi:10.1038/nmeth.1670
- Patterson, B., Landay, A. & Andersson, J. (1998). Repertoire of chemokine receptor expression in the female genital tract: implications for human immunodeficiency virus transmission. *The American Journal of Pathology*, 153(2), 481–490.

- Perez, E. E., Wang, J., Miller, J. C., Jouvenot, Y., Kim, K. a, Liu, O., ... June, C. H. (2008). Establishment of HIV-1 resistance in CD4+ T cells by genome editing using zinc-finger nucleases. *Nature Biotechnology*, 26(7), 808–16. doi:10.1038/nbt1410
- Perreau, M., Pantaleo, G. & Kremer, E. J. (2008). Activation of a dendritic cell-T cell axis by Ad5 immune complexes creates an improved environment for replication of HIV in T cells. *The Journal of Experimental Medicine*, 205(12), 2717–25. doi:10.1084/jem.20081786
- Pham, H.-P., Manuel, M., Petit, N., Klatzmann, D., Cohen-Kaminsky, S., Six, A. & Marodon, G. (2012). Half of the T-cell repertoire combinatorial diversity is genetically determined in humans and humanized mice. *European Journal of Immunology*, 42(3), 760–70. doi:10.1002/eji.201141798
- Pino, S., Brehm, M. A., Covassin-Barberis, L., King, M., Chase, T. H., Wagner, J., ... Shultz, L. D. (2010). Development of novel major histocompatibility complex class I and class II deficient NOD-SCID IL2R gamma chain knockout mice for modeling human xenogeneic graft-versus-host disease. *Methods Mol Biol*, 602, 105–117. doi:10.1007/978-1-60761-058-8
- Pitisuttithum, P., Gilbert, P., Gurwith, M., Heyward, W., Martin, M., Griensven, F. Van, ... Group, E. (2006). Efficacy Trial of a Bivalent Recombinant Glycoprotein 120 HIV-1 Vaccine among Injection Drug Users in Bangkok , Thailand. *The Journal of Infectious Diseases*.
- Podsakoff, G. M., Engel, B. C., Carbonaro, D. a, Choi, C., Smogorzewska, E. M., Bauer, G., ... Kohn, D. B. (2005). Selective survival of peripheral blood lymphocytes in children with HIV-1 following delivery of an anti-HIV gene to bone marrow CD34(+) cells. *Molecular Therapy : The Journal of the American Society of Gene Therapy*, 12(1), 77–86. doi:10.1016/j.ymthe.2005.02.024
- Powderly, W. G., Landay, a & Lederman, M. M. (1998). Recovery of the immune system with antiretroviral therapy: the end of opportunism? *JAMA: The Journal of the American Medical Association*, 280(1), 72–7.
- Racki, W., Covassin, L., Brehm, M. & Pino, S. (2010). NOD-scid IL2rynull (NSG) Mouse Model of Human Skin Transplantation and Allograft Rejection. *Transplantation*, 89(5), 527–536. doi:10.1097/TP.0b013e3181c90242.NOD-
- Ramezani, a, Hawley, T. S. & Hawley, R. G. (2000). Lentiviral vectors for enhanced gene expression in human hematopoietic cells. *Molecular Therapy : The Journal of the American Society of Gene Therapy*, 2(5), 458–69. doi:10.1006/mthe.2000.0190
- Rerks-Ngarm, S. (2009). Vaccination with ALVAC and AIDSVAX to prevent HIV-1 infection in Thailand. *The New England Journal of Medicine*, 361(23), 2209–2220.
- Ringpis, G., Shimizu, S. & Arokium, H. (2012). Engineering HIV-1-resistant T-cells from short-hairpin RNA-expressing hematopoietic stem/progenitor cells in humanized BLT mice. *PloS One*, 7(12), e53492. doi:10.1371/journal.pone.0053492
- Roberts, M. R., Qin, L., Zhang, D., Smith, D. H., Tran, a C., Dull, T. J., ... Finer, M. H. (1994). Targeting of human immunodeficiency virus-infected cells by CD8+ T lymphocytes armed with universal T-cell receptors. *Blood*, 84(9), 2878–89.
- Roche, M., Jakobsen, M. R., Ellett, A., Salimisedabad, H., Jubb, B., Westby, M., ... Gorry, P. R. (2011). HIV-1 predisposed to acquiring resistance to maraviroc (MVC) and other CCR5 antagonists in vitro has an inherent, low-level ability to utilize MVC-bound CCR5 for entry. *Retrovirology*, 8(1), 89. doi:10.1186/1742-4690-8-89
- Roe, T., Reynolds, T. C., Yu, G. & Brown, P. O. (1993). Integration of murine leukemia virus DNA depends on mitosis. *The EMBO Journal*, 12(5), 2099–2108.
- Rold, C. J. & Aiken, C. (2008). Proteasomal degradation of TRIM5alpha during retrovirus restriction. *PLoS Pathogens*, 4(5), e1000074. doi:10.1371/journal.ppat.1000074

- Rongvaux, A., Takizawa, H., Strowig, T., Willinger, T., Eynon, E. E., Flavell, R. a & Manz, M. G. (2013). *Human hemato-lymphoid system mice: current use and future potential for medicine. Annual review of immunology* (Vol. 31, pp. 635–74). doi:10.1146/annurev-immunol-032712-095921
- Rongvaux, A., Willinger, T., Martinek, J., Strowig, T., Gearty, S. V, Teichmann, L. L., ... Flavell, R. a. (2014). Development and function of human innate immune cells in a humanized mouse model. *Nature Biotechnology*, 32(4), 364–72. doi:10.1038/nbt.2858
- Rongvaux, A., Willinger, T., Takizawa, H., Rathinam, C., Auerbach, W., Murphy, A. J., ... Flavell, R. a. (2011). Human thrombopoietin knockin mice efficiently support human hematopoiesis in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(6), 2378–83. doi:10.1073/pnas.1019524108
- Ryan, M. D., King, a M. & Thomas, G. P. (1991). Cleavage of foot-and-mouth disease virus polyprotein is mediated by residues located within a 19 amino acid sequence. *The Journal of General Virology*, 72 (Pt 11, 2727–32.
- S.Hacein-Bey-Abina, F. Le Deist, F. Carlier, C. Bouneaud, C. Hue, J.P. De Villartay, A. J. Thrasher, N. Wulffraat, R. Sorensen, S. Dupuis-Girod, A. Fischer, M. C.-C. (2002). Sustained correction of X-linked severe combined immunodeficiency by ex vivo gene therapy. ... *England Journal of ...*, 346(16), 1185–1193.
- Saito, N., Chono, H., Shibata, H., Ageyama, N., Yasutomi, Y. & Mineno, J. (2013). Nonhuman primate model for HIV-1 gene therapy using endoribonuclease MazF transduced CD4 + T cells in the presence of SHIV 89 . 6P infection. *Summary of Presentation at 19th Annual Meeting of Japan Society of Gene Therapy*, 23585.
- Samson, M., Libert, F., Doranz, B. & Rucker, J. (1996). Resistance to HIV-1 infection in caucasian individuals bearing mutant alleles of the CCR-5 chemokine receptor gene. *Nature*, 382, 722–725.
- Sato, W., Tomita, A., Ichikawa, D., Lin, Y., Kishida, H., Miyake, S., ... Yamamura, T. (2012). CCR2(+)CCR5(+) T cells produce matrix metalloproteinase-9 and osteopontin in the pathogenesis of multiple sclerosis. *The Journal of Immunology*, 189(10), 5057–65. doi:10.4049/jimmunol.1202026
- Schatz, D. G., Oettinger, M. a & Baltimore, D. (1989). The V(D)J recombination activating gene, RAG-1. *Cell*, 59(6), 1035–48.
- Scheideman, E., Marlatt, S. & Xie, Y. (2012). Transmembrane protein aptamers that inhibit CCR5 expression and HIV coreceptor function. *Journal of Virology*. doi:10.1128/JVI.00910-12
- Scholler, J., Brady, T. L., Binder-Scholl, G., Hwang, W.-T., Plesa, G., Hege, K. M., ... June, C. H. (2012). Decade-long safety and function of retroviral-modified chimeric antigen receptor T cells. *Science Translational Medicine*, 4(132), 132ra53. doi:10.1126/scitranslmed.3003761
- Schröder, A. R. W., Shinn, P., Chen, H., Berry, C., Ecker, J. R. & Bushman, F. (2002). HIV-1 integration in the human genome favors active genes and local hotspots. *Cell*, 110(4), 521–9.
- Schroder, K. & Tschopp, J. (2010). The inflammasomes. *Cell*, 140(6), 821–32. doi:10.1016/j.cell.2010.01.040
- Schroers, R., Davis, C. M., Wagner, H.-J. & Chen, S.-Y. (2002). Lentiviral transduction of human T-lymphocytes with a RANTES intrakine inhibits human immunodeficiency virus type 1 infection. *Gene Therapy*, 9(13), 889–97. doi:10.1038/sj.gt.3301711
- Schuitemaker, H. & Koot, M. (1992). human immunodeficiency virus type 1 clones at different stages of infection: progression of disease is associated with a shift from monocytotropic to T-cell-tropic virus. *Journal of Virology*, 66, 1354–1360.
- Seay, K., Qi, X., Zheng, J. H., Zhang, C., Chen, K., Dutta, M., ... Goldstein, H. (2013). Mice transgenic for CD4-specific human CD4, CCR5 and cyclin T1 expression: a new model

- for investigating HIV-1 transmission and treatment efficacy. *PloS One*, 8(5), e63537. doi:10.1371/journal.pone.0063537
- Shi, C. & Pamer, E. G. (2011). Monocyte recruitment during infection and inflammation. *Nature Reviews. Immunology*, 11(11), 762–74. doi:10.1038/nri3070
- Shimizu, S., Hong, P., Arumugam, B., Pokomo, L., Boyer, J., Koizumi, N., ... An, D. S. (2013). A highly efficient short hairpin RNA potentially down-regulates CCR5 expression in systemic lymphoid organs in the hu-BLT mouse model. *Blood*, 115(8), 1534–1544. doi:10.1182/blood-2009-04-215855.
- Shinohara, T., Singh, D. P. & Fatma, N. (2002). LEDGF, a survival factor, activates stress-related genes. *Progress in Retinal and Eye Research*, 21(3), 341–58.
- Shioda, T., Levy, J. & Cheng-Mayer, C. (1991). Macrophage and T cell-line tropisms of HIV-1 are determined by specific regions of the envelope gp 120 gene. *Nature*, 349, 167–169.
- Shultz, L. D., Brehm, M. a, Garcia-Martinez, J. V. & Greiner, D. L. (2012). Humanized mice for immune system investigation: progress, promise and challenges. *Nature Reviews. Immunology*, 12(11), 786–98. doi:10.1038/nri3311
- Shultz, L. D., Ishikawa, F. & Greiner, D. L. (2007). Humanized mice in translational biomedical research. *Nature Reviews. Immunology*, 7(2), 118–30. doi:10.1038/nri2017
- Shultz, L. D., Lyons, B. L., Burzenski, L. M., Gott, B., Chen, X., Chaleff, S., ... Handgretinger, R. (2005). Human Lymphoid and Myeloid Cell Development in NOD/LtSz-scid IL2R null Mice Engrafted with Mobilized Human Hemopoietic Stem Cells. *The Journal of Immunology*, 174(10), 6477–6489. doi:10.4049/jimmunol.174.10.6477
- Shultz, L. D., Miller, D., King, M., Laning, J., Fodor, W., Cuthbert, A., ... Greiner, D. L. (2008). Non-obese diabetic-recombination activating gene-1 (NOD-Rag1 null) interleukin (IL)-2 receptor common gamma chain (IL2r gamma null) null mice: a radioresistant model for human lymphohaematopoietic engraftment. *Clinical and Experimental Immunology*, 154(2), 270–84. doi:10.1111/j.1365-2249.2008.03753.x
- Shultz, L. & Saito, Y. (2010). Generation of functional human T-cell subsets with HLA-restricted immune responses in HLA class I expressing NOD/SCID/IL2rynull humanized mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(29), 13022–13027. doi:10.1073/pnas.1000475107/-DCSupplemental.www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1000475107
- Sipley, J. D., Menninger, J. C., Hartley, K. O., Ward, D. C., Jackson, S. P. & Anderson, C. W. (1995). Gene for the catalytic subunit of the human DNA-activated protein kinase maps to the site of the XRCC7 gene on chromosome 8. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(16), 7515–9.
- Sirven, a, Pflumio, F., Zennou, V., Titeux, M., Vainchenker, W., Coulombel, L., ... Charneau, P. (2000). The human immunodeficiency virus type-1 central DNA flap is a crucial determinant for lentiviral vector nuclear import and gene transduction of human hematopoietic stem cells. *Blood*, 96(13), 4103–10.
- Skubis-Zegadło, J., Stachurska, A. & Małcki, M. (2013). Vectors of adeno-associated viruses (AAV). *Medycyna Wieku Rozwojowego*, 17(3), 202–6.
- Sloan, R. D. & Wainberg, M. a. (2011). The role of unintegrated DNA in HIV infection. *Retrovirology*, 8(1), 52. doi:10.1186/1742-4690-8-52
- Smith, B. K., Collins, S. W., Conlon, T. J., Mah, C. S., Lawson, L. A., Martin, A. D., ... Byrne, B. J. (2013). Phase I/II trial of adeno-associated virus-mediated alpha-glucosidase gene therapy to the diaphragm for chronic respiratory failure in Pompe disease: initial safety and ventilatory outcomes. *Human Gene Therapy*, 24(6), 630–40. doi:10.1089/hum.2012.250
- Speck, R. F., Penn, M. L., Wimmer, J., Esser, U., Hague, B. F., Kindt, T. J., ... Wimmer, R. G. (1998). Rabbit Cells Expressing Human CD4 and Human CCR5 Are Highly

- Permissive for Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection Rabbit Cells Expressing Human CD4 and Human CCR5 Are Highly Permissive for Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection. *Journal of Virology*, 72, 5728–5734.
- Stevenson, M. (2013). CROI 2013: Basic science review. *Topics in Antiviral Medicine*, 21(2), 42–6.
- Stremlau, M., Owens, C. M., Perron, M. J., Kiessling, M., Autissier, P. & Sodroski, J. (2004). The cytoplasmic body component TRIM5 α restricts HIV-1 infection in Old World monkeys. *Nature*, 427, 848–853. doi:10.1038/nature02343
- Sun, L. Q., Wang, L., Gerlach, W. L. & Symonds, G. (1995). Target sequence-specific inhibition of HIV-1 replication by ribozymes directed to tat RNA. *Nucleic Acids Research*, 23(15), 2909–13.
- Sun, Z., Denton, P. W., Estes, J. D., Othieno, F. A., Wei, B. L., Wege, A. K., ... Padgett-Thomas, A. (2007). Intrarectal transmission, systemic infection, and CD4+ T cell depletion in humanized mice infected with HIV-1. *The Journal of Experimental Medicine*, 204(4), 705–14. doi:10.1084/jem.20062411
- Sundquist, W. I. & Kräusslich, H.-G. (2012). HIV-1 assembly, budding, and maturation. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2(7), 1–24. doi:10.1101/cshperspect.a006924
- Suzuki, M., Takahashi, T., Katano, I., Ito, R., Ito, M., Harigae, H., ... Sugamura, K. (2012). Induction of human humoral immune responses in a novel HLA-DR-expressing transgenic NOD/Shi-scid/ γ cnnull mouse. *International Immunology*, 24(4), 243–52. doi:10.1093/intimm/dxs045
- Swan, C. H. & Bu, B. (2007). T-cell protection and enrichment through lentiviral CCR5 intrabody gene delivery, 7128. doi:10.1038/sj.gt.3302902
- Swan, C. H., Bühler, B., Steinberger, P., Tschan, M. P., Barbas, C. F. & Torbett, B. E. (2006). T-cell protection and enrichment through lentiviral CCR5 intrabody gene delivery. *Gene Therapy*, 13(20), 1480–92. doi:10.1038/sj.gt.3302801
- Takenaka, K., Prasolava, T. K., Wang, J. C. Y., Mortin-Toth, S. M., Khalouei, S., Gan, O. I., ... Danska, J. S. (2007). Polymorphism in Sirpa modulates engraftment of human hematopoietic stem cells. *Nature Immunology*, 8(12), 1313–23. doi:10.1038/ni1527
- Tan, M. C. B., Goedegebuure, P. S., Belt, B. a., Flaherty, B., Sankpal, N., Gillanders, W. E., ... Linehan, D. C. (2009). Disruption of CCR5-Dependent Homing of Regulatory T Cells Inhibits Tumor Growth in a Murine Model of Pancreatic Cancer. *The Journal of Immunology*, 182(3), 1746–1755. doi:10.4049/jimmunol.182.3.1746
- Tebas, P., Stein, D., Binder-scholl, G., Mukherjee, R., Brady, T., Rebello, T., ... June, C. H. (2013). Antiviral effects of autologous CD4 T cells genetically modified with a conditionally replicating lentiviral vector expressing long antisense to HIV. *Blood*, 121(9), 1524–1533. doi:10.1182/blood-2012-07-447250.
- Tebas, P., Stein, D., Tang, W. W., Frank, I., Wang, S. Q., Lee, G., ... June, C. H. (2014). Gene editing of CCR5 in autologous CD4 T cells of persons infected with HIV. *The New England Journal of Medicine*, 370(10), 901–10. doi:10.1056/NEJMoa1300662
- Traggiai, E., Chicha, L., Mazzucchelli, L., Bronz, L., Piffaretti, J.-C., Lanzavecchia, A. & Manz, M. G. (2004). Development of a human adaptive immune system in cord blood cell-transplanted mice. *Science (New York, N.Y.)*, 304(5667), 104–7. doi:10.1126/science.1093933
- Tran, A., Zhang, D., Byrn, R. & Roberts, M. R. (1995). Chimeric 5-Receptors Direct Human Natural Killer (NK) Effector Function to Permit Killing of NK-Resistant Tumor. *The Journal of Immunology*, 155, 1000–1009.
- Trobridge, G., Wu, R., Beard, B. & Chiu, S. (2009). Protection of stem cell-derived lymphocytes in a primate AIDS gene therapy model after in vivo selection. *PLoS One*, 4(11), 1–10. doi:10.1371/journal.pone.0007693
- UNAIDS. (2013). AIDS by the numbers.

- Urnov, F. D., Miller, J. C., Lee, Y.-L., Beausejour, C. M., Rock, J. M., Augustus, S., ... Holmes, M. C. (2005). Highly efficient endogenous human gene correction using designed zinc-finger nucleases. *Nature*, 435(7042), 646–51. doi:10.1038/nature03556
- Verdin, E., Paras, P. & Van Lint, C. (1993). Chromatin disruption in the promoter of human immunodeficiency virus type 1 during transcriptional activation. *The EMBO Journal*, 12(8), 3249–59.
- Verma, I. M. & Weitzman, M. D. (2005). Gene therapy: twenty-first century medicine. *Annual Review of Biochemistry*, 74(1), 711–38. doi:10.1146/annurev.biochem.74.050304.091637
- Vets, Sofie, Janine Kimpel , Andreas Volk , Jan De Rijck , Rik Schrijvers , Bert Verbinnen , Wim Maes , Dorothee Von Laer, Z. D. and R. G. (2012). Lens Epithelium-derived Growth Factor/p75 Qualifies as a Target for HIV Gene Therapy in the NSG Mouse Model. *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy*, 20(5), 927–37. doi:10.1038/mt.2012.10
- Volk, A., Hartmann, S., Muik, A., Geiß, Y., Königs, C., Dietrich, U. & Laer, D. Von. (2012). Comparison of three humanized mouse models for adoptive T cell transfer. *The Journal of Gene Medicine*, 14(May), 540–548. doi:10.1002/jgm
- Walasek, M. a, van Os, R. & de Haan, G. (2012). Hematopoietic stem cell expansion: challenges and opportunities. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1266, 138–50. doi:10.1111/j.1749-6632.2012.06549.x
- Walker, J. E., Chen, R. X., McGee, J., Nacey, C., Pollard, R. B., Abedi, M., ... Anderson, J. S. (2012). Generation of an HIV-1-resistant immune system with CD34(+) hematopoietic stem cells transduced with a triple-combination anti-HIV lentiviral vector. *Journal of Virology*, 86(10), 5719–29. doi:10.1128/JVI.06300-11
- Wang, H. & Madariaga, M. (2007). Lack of CD47 on nonhematopoietic cells induces split macrophage tolerance to CD47null cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104, 13744–13749.
- Watanabe, S., Ohta, S., Yajima, M., Terashima, K., Ito, M., Mugishima, H., ... Yamamoto, N. (2007). Humanized NOD/SCID/IL2Rgamma(null) mice transplanted with hematopoietic stem cells under nonmyeloablative conditions show prolonged life spans and allow detailed analysis of human immunodeficiency virus type 1 pathogenesis. *Journal of Virology*, 81(23), 13259–64. doi:10.1128/JVI.01353-07
- Watanabe, S., Terashima, K., Ohta, S., Horibata, S., Yajima, M., Shiozawa, Y., ... Yamamoto, N. (2007). Hematopoietic stem cell-engrafted NOD/SCID/IL2Rgamma null mice develop human lymphoid systems and induce long-lasting HIV-1 infection with specific humoral immune responses. *Blood*, 109(1), 212–8. doi:10.1182/blood-2006-04-017681
- Wei, P., Garber, M. E., Fang, S. M., Fischer, W. H. & Jones, K. a. (1998). A novel CDK9-associated C-type cyclin interacts directly with HIV-1 Tat and mediates its high-affinity, loop-specific binding to TAR RNA. *Cell*, 92(4), 451–62.
- Wei, X., Ghosh, S., Taylor, M. & Johnson, V. (1995). Viral dynamics in human immunodeficiency virus type 1 infection. *Nature*, 373, 117–122.
- Weinberger, L., Schaffer, D. & Arkin, A. (2003). Theoretical design of a gene therapy to prevent AIDS but not human immunodeficiency virus type 1 infection. *Journal of Virology*, 77(18). doi:10.1128/JVI.77.18.10028
- Weissenhorn, W., Dessen, A. & Harrison, S. (1997). Atomic structure of the ectodomain from HIV-1 gp41. *Nature*, 387, 426–430.
- Westby, M., Lewis, M., Whitcomb, J., Pozniak, A. L., James, I. T., Jenkins, T. M., ... Youle, M. (2006). Emergence of CXCR4-Using Human Immunodeficiency Virus Type 1 (HIV-1) Variants in a Minority of HIV-1-Infected Patients following Treatment with the CCR5 Antagonist Maraviroc Is from a Pretreatment CXCR4-Using Virus Reservoir

- Emergence of CXCR4-Using Hum. *Journal of Virology*, 1, 4909–4920. doi:10.1128/JVI.80.10.4909
- Wilen, C. B., Wang, J., Tilton, J. C., Miller, J. C., Kim, K. a, Rebar, E. J., ... Doms, R. W. (2011). Engineering HIV-resistant human CD4+ T cells with CXCR4-specific zinc-finger nucleases. *PLoS Pathogens*, 7(4), 1–15. doi:10.1371/journal.ppat.1002020
- Williams, K. C., Corey, S., Westmoreland, S. V, Pauley, D., Knight, H., deBakker, C., ... Lackner, a a. (2001). Perivascular macrophages are the primary cell type productively infected by simian immunodeficiency virus in the brains of macaques: implications for the neuropathogenesis of AIDS. *The Journal of Experimental Medicine*, 193(8), 905–15.
- Willinger, T., Rongvaux, A., Strowig, T., Manz, M. G. & Flavell, R. a. (2011). Improving human hemato-lymphoid-system mice by cytokine knock-in gene replacement. *Trends in Immunology*, 32(7), 321–7. doi:10.1016/j.it.2011.04.005
- Woffendin, C. & Ranga, U. (1996). Expression of a protective gene-prolongs survival of T cells in human immunodeficiency virus-infected patients. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(April), 2889–2894.
- Wong, J., Strain, M. & Porrata, R. (2010). In vivo CD8+ T-cell suppression of siv viremia is not mediated by CTL clearance of productively infected cells. *PLoS Pathogens*, 6(1), 1–12. doi:10.1371/journal.ppat.1000748
- Wong-Staal, F., Poeschla, E. M. & Looney, D. J. (1998). A controlled, Phase 1 clinical trial to evaluate the safety and effects in HIV-1 infected humans of autologous lymphocytes transduced with a ribozyme that cleaves HIV-1 RNA. *Human Gene Therapy*, 9(16), 2407–25. doi:10.1089/hum.1998.9.16-2407
- Wu, X., Li, Y., Crise, B. & Burgess, S. M. (2003). Transcription start regions in the human genome are favored targets for MLV integration. *Science*, 300(5626), 1749–51. doi:10.1126/science.1083413
- Yamada, O., Kraus, G., Leavitt, M., Yu, M. & Wong-Staal, F. (1994). Activity and cleavage site specificity of an anti-HIV-1 hairpin ribozyme in human T cells. *Virology*, 205, 121–126.
- Yamauchi, T., Takenaka, K., Urata, S., Shima, T., Kikushige, Y., Tokuyama, T., ... Akashi, K. (2013). Polymorphic Sirpa is the genetic determinant for NOD-based mouse lines to achieve efficient human cell engraftment. *Blood*, 121(8), 1316–25. doi:10.1182/blood-2012-06-440354
- Yan, N. & Chen, Z. J. (2012). Intrinsic antiviral immunity. *Nature Immunology*, 13(3), 214–22. doi:10.1038/ni.2229
- Yan, N., Regalado-Magdos, A. D., Stiggelbout, B., Lee-Kirsch, M. A. & Lieberman, J. (2010). The cytosolic exonuclease TREX1 inhibits the innate immune response to human immunodeficiency virus type 1. *Nature Immunology*, 11, 1005–1013. doi:10.1038/ni.1941
- Yee, C. (2014). The use of endogenous T cells for adoptive transfer. *Immunological Reviews*, 257(1), 250–63. doi:10.1111/imr.12134
- Younan, P. & Polacino, P. (2013). Positive selection of mC46-expressing CD4+ T cells and maintenance of virus specific immunity in a primate AIDS model. *Blood*, 122(2), 179–187. doi:10.1182/blood-2013-01-482224.The
- Yuan, J., Wang, J., Crain, K., Fearn, C. & Kim, K. (2012). Zinc-finger Nuclease Editing of Human cxcr4 Promotes HIV-1 CD4+ T Cell Resistance and Enrichment. *Molecular Therapy*, 20(4), 849–859. doi:10.1038/mt.2011.310
- Zaitseva, M., Blauvelt, A. & Lee, S. (1997). Expression and function of CCR5 and CXCR4 on human Langerhans cells and macrophages: implications for HIV primary infection. *Nature Medicine*, 3(12), 1369–1375.

Zaunders, J. (2001). Increased turnover of CCR5+ and redistribution of CCR5- CD4 T lymphocytes during primary human immunodeficiency virus type 1 infection. *Journal of Infectious Diseases*, 183, 736-743.

Annexe : Liste des publications scientifiques et présentations orales

1 Publications scientifiques

Targeting both viral and host determinants of HIV entry using a new lentiviral vector co-expressing the T20 fusion inhibitor and a selective CCL5 intrakine.

Petit N, Dorgham K; Bault B; Burlion A; Gorochov G; Marodon G
Human Gene Therapy method; 2014 Juil

Half of the T-cell repertoire combinatorial diversity is genetically determined in humans and humanized mice.

Pham HP, Manuel M, **Petit N**, Klitzmann D, Cohen-Kaminsky S, Six A, Marodon G.
European Journal of Immunology 2011 Dec

Neonatal bone marrow transplantation prevents liver disease in a murine model of erythropoietic protoporphyria.

Petit N, Duchartre Y, Moya C, Lalanne M, Dubus P, de Verneuil H, Moreau-Gaudry F, Richard E. (Co-premier auteur)
J Hepatol. 2010 Oct

2 Présentations orales

2014 annual meeting of the Société Française Thérapie Cellulaire et Génique (SFTCG)(Montpellier):

Gene therapy of HIV infection by two inhibitors of viral entry in humanized mice

2011 annual meeting of the Société Française Thérapie Cellulaire et Génique (SFTCG)(Nantes) :

Progress towards gene therapy of HIV infection in humanized mice

Table des illustrations

Figure 1 : Mécanisme de Cis- et Trans- infection du VIH par les DC.

Figure 2 : Représentation schématique du génome du VIH.

Figure 3 : Mécanismes de repliement de la gp41 permettant la fusion du VIH avec la cellule hôte.

Figure 4 : Etapes de la rétrotranscription

Figure 5 : Mécanismes moléculaire de l'intégration du VIH.

Figure 6 : Mécanisme d'action des facteurs de restrictions sur le cycle virale.

Figure 7 : Evolution de la charge virale et de la déplétion des lymphocytes T CD4 chez l'homme dans un contexte sans antirétroviraux.

Figure 8 : Evolution de la charge virale et de l'activation immunitaire chez l'Homme, le macaque rhésus d'Asie et deux singes africains.

Figure 9 : Résultats de l'essai RV144 sur l'incidence du VIH.

Figure 10 : Cinétique thérapeutique du Patient de Berlin

Figure 11 : Pathologies traitées en essais cliniques par thérapies géniques.

Figure 12 : Schéma des génomes des principaux virus utilisés en thérapie génique.

Figure 13 : représentation schématique des plasmides permettant la production de vecteurs lentiviraux de première génération.

Figure 14 : Représentation schématique d'un couple de ZFN.

Figure 15 : Schéma représentant la dégradation des lentivirus via le facteur de restriction TRIM5 α .

Figure 16 : Représentation des différentes structures ciblées par des anticorps neutralisant ciblant la gp160.

Figure 17 : Représentation schématique de l'interaction du peptide C46 sur la gp41 (A).
Représentation schématique du transgène portant le peptide C46 (B).

Figure 18 : Schéma d'une stratégie d'inhibition d'entrée avec un vecteur mobilisable

Résumé

L'infection par le Virus de l'Immunodéficience Humaine, malgré des chiffres de mortalité et de nouvelles infections en baisse dans le monde, reste un problème majeur de santé publique. En particulier, l'absence de vaccins efficaces, le développement ralenti de nouvelles molécules thérapeutiques et l'émergence de résistances sont des freins à l'éradication du virus. Parmi les nouvelles stratégies thérapeutiques, la thérapie génique contre le VIH connaît actuellement un regain d'intérêt. La description du premier cas de guérison avéré après greffe de cellules souches mutantes pour le corécepteur majeur du VIH (CCR5) a relancé l'intérêt de la communauté pour développer des stratégies de thérapies géniques ciblant CCR5.

Durant ma thèse, j'ai développé une stratégie basée sur l'inhibition de l'entrée du virus dans les lymphocytes T CD4 humains, seule capable de prévenir la mort des cellules infectées de façon abortive. Nos gènes thérapeutiques comprennent un inhibiteur de fusion membranaire (peptide C46) et un inhibiteur d'expression de CCR5, dérivé du ligand de CCR5. J'ai validé cette stratégie en utilisant des vecteurs lentiviraux de transfert de gènes, paradoxalement dérivés du VIH lui-même. L'expertise de l'équipe dans les modèles de souris humanisées m'a permis de valider l'intérêt pré-clinique de cette stratégie dans un modèle de transfert de lymphocytes T modifiés. Après avoir montré *in vitro* que la protection des cellules humaines dépendait en partie de la dose de virus utilisé pour l'infection, j'ai pu montrer que les lymphocytes T modifiés possédaient un avantage sélectif massif *in vivo* comparé à des cellules non protégées. Cet avantage se doublait d'une protection totale des cellules modifiées contre la délétion induite par le VIH, montrant que l'expression combinée des deux inhibiteurs d'entrée protégeaient totalement les cellules de l'infection. Malgré cela, les charges virales n'étaient pas différentes entre groupes de souris ayant reçu des cellules modifiées ou des cellules contrôles. Nous pensons que cette observation ne remet pas en cause l'intérêt de la stratégie, car des observations similaires ont été faites avec des stratégies que l'on retrouve pourtant en clinique. De plus, il est possible que le choix du modèle ait fortement influencé le résultat. En effet, alors que la dynamique virale est très différente dans le modèle de souris humanisées par transfert de lymphocytes comparée à celle observée chez les patients, j'ai montré que celle-ci est beaucoup plus proche des patients dans les modèles de souris humanisées suite au transfert de progéniteurs hématopoïétiques. L'effet de la stratégie sur la charge virale sera peut-être plus probant à analyser dans ce modèle de souris humanisées. Cette étude nous montre aussi qu'il n'est pas nécessaire d'invoquer la réponse immune, dont je montre l'inefficacité dans ce modèle, pour expliquer les profils de réplication virale observés dans la phase primaire de l'infection. Ce résultat suggère donc qu'une partie de la dynamique virale est dépendante du nombre de cellules à infecter et du nombre de virions disponibles, résultat déjà suggéré par des modèles mathématiques mais rarement soutenu par des données biologiques. En revanche, nos résultats suggèrent que le changement de tropisme du VIH d'un virus utilisant CCR5 vers CXCR4 pourrait dépendre de la réponse immunitaire, car nous n'observons pas un tel changement dans nos souris. L'ensemble des résultats de ma thèse a permis (i) de faire progresser notre compréhension de la dynamique virale, et (ii) de valider la combinaison d'inhibiteurs d'entrée dans un vecteur lentiviral comme stratégie prometteuse pour une application clinique.

[Pre-clinical study of an HIV gene therapy strategy combining two entry inhibitors]

Abstract :

Mortality and new infections by the Human Immunodeficiency Virus are slowly decreasing worldwide. However, due to the lack of a preventive vaccine, it remains a major public health concern for the future. Among new therapeutic strategies to fight the infection, gene therapy targeting CCR5 will be an asset. Indeed, the first patient to be cured from the infection received hematopoietic progenitors deprived of CCR5. This finding has ignited a flurry of research on genetic means to decrease CCR5 from the cell surface.

During my PhD, I developed a strategy based on entry inhibition of HIV in CD4 T cells, the only strategy able to prevent cell death induced by abortive infection. Our therapeutic genes are a membrane fusion inhibitor (the C46 peptide) and a CCR5 expression inhibitor, based on a super-agonist ligand. To validate this strategy, I used lentiviral-based gene transfer vector, paradoxically derived from HIV itself. The experience of the team in humanized mice models allowed the validation of the strategy *in vivo* in a model of gene-modified T cell transfer. I first showed that the combination of the transgenes was able to prevent HIV infection *in vitro* in a dose dependent manner. Most importantly, I then showed that this protection conferred modified T cells with a huge selective advantage *in vivo*. This advantage was associated with a complete protection of CD4 T cells from HIV-induced deletion. Despite this impressive phenotype, no effect on the viral load has been documented. We think that this latter observation does not jeopardize the strategy as a whole since similar observations were made with strategies found in clinical trials. Moreover, it is very likely that the choice of the model has impacted on the result. Indeed, whereas the viral dynamic is very different in mice reconstituted with mature T cells from what is observed in human patients, I showed that this dynamic is closer to the primary phase of the infection in mice humanized with hematopoietic progenitors. Conclusions on the effect of our strategy on viral loads will be more relevant in this model. This study also teaches us that it is not necessary to invoke the immune response to HIV, that we show to be deficient in humanized mice, to explain the profiles of viral replication observed early after infection. This result suggests that part of the viral dynamic is dependent on the target/virus ratio, as predicted by mathematical models but rarely exemplified by biological data. To the contrary, our results suggest that the switch from R5 to X4-tropic virus might depends on the immune response, because it is not observed in our humanized mice. Together, results collected during my PhD thesis provides new information on viral dynamic and establish the interest of combining two viral entry inhibitors for gene therapy of HIV infection.