



**HAL**  
open science

# Impact des inhibiteurs de l'intégrase sur la constitution et la compartimentalisation du réservoir viral

Pierre Gantner

► **To cite this version:**

Pierre Gantner. Impact des inhibiteurs de l'intégrase sur la constitution et la compartimentalisation du réservoir viral. Virologie. Université de Strasbourg, 2018. Français. NNT: 2018STRAJ018 . tel-02918141

**HAL Id: tel-02918141**

**<https://theses.hal.science/tel-02918141v1>**

Submitted on 20 Aug 2020

**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.

**ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE**  
**INSERM UMR-S U1109**

**THÈSE** présentée par :

**Pierre GANTNER**

soutenue le : **22 Mai 2018**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université de Strasbourg**

Discipline / Spécialité : **Virologie**

**Impact des inhibiteurs de l'intégrase  
sur la constitution et la  
compartimentalisation du réservoir viral**

**THÈSE dirigée par :**

**Mme FAFI-KREMER Samira**

PU-PH, Université de Strasbourg

**RAPPORTEURS :**

**Mme DESCAMPS Diane**

PU-PH, Universités Paris-Diderot et Nord

**M BARIN Francis**

PU-PH, Université de Tours

---

**AUTRES MEMBRES DU JURY :**

**M MARTIN Thierry**

PU-PH, Université de Strasbourg

## Remerciements

A Madame le Professeur Diane Descamps,

A Monsieur le Professeur Francis Barin,

A Monsieur le Professeur Thierry Martin,

vous me faites l'honneur d'accepter de juger ce travail, veuillez trouver ici l'expression de mes sincères remerciements et de mon profond respect.

A Monsieur le Docteur David Rey,

pour avoir accepté de juger à nouveau mon travail, je te remercie pour ton aide et ton soutien dans toutes les expériences que nous avons partagées. Tes qualités professionnelles et humaines m'ont permis de m'épanouir dans nos entreprises.

A Madame le Professeur Samira Fafi-Kremer,

qui me fait l'honneur de m'avoir accueilli dans son équipe et de diriger cette thèse, veuillez trouver l'expression de ma plus profonde et respectueuse reconnaissance pour votre confiance et votre soutien dans la réalisation de nos projets passés et à venir.

A Mesdames et Messieurs les Docteurs Marie-Laure Batard, Charles Beck, Geneviève Beck-Wirth, Claudine Bernard-Henry, Christine Cheneau, Jean-Pierre Faller, Vincent Gendrin, Martin Martinot, Erik de Mautort, Catherine Michel, Mahsa Mosheni-Zadeh, Marialuisa Partisani et Michèle Priester, Béatrice Rosolen, Olivier Ruyer

pour leur participation active et leur motivation aux inclusions dans l'étude DRONE.

A Mesdames les Infirmières Diplômées d'Etat spécialistes du VIH Béatrice Lindecker, Idalina Paupart, Sophie Revollon, Mélanie Rovere et Sylvie Dontenville,

pour nos déjeuners ensoleillés et pour vos qualités humaines.

A Madame Patrica Fischer,

pour son empathie et son excellente gestion de l'étude DRONE

A mes collaborateurs des centres de Belfort, Colmar et Mulhouse, John Beckrich, Meryem Benomar, Charlotte Bourgoïn, Francine Bury, Bassam Isaac, Gaëlle Ioriol et Anne Pachart,

pour avoir répondu à toutes mes sollicitations.

A Madame Anne Fuchs,

sans qui il n'y aurait pas eu un seul résultat dans cette thèse, merci pour tes encouragements, ta bonne humeur, ton professionnalisme et ton amitié.

A Monsieur Frédéric Jégou,

pour ton professionnalisme, ton humour et ta persévérance.

A Madame Stéphanie Bertsch,

pour ta rigueur et ta sympathie.

A Madame Véronique Sohn,

pour tes encouragements et ta bonne humeur.

A Mesdames et Messieurs Nathalie Durand, Anne Ertle, Rachel Freitag, Sandrine Fritsch, Sylvain Garnier, Marie-Marie Hemion, Clarisse Kindler, Véronique Kromer, Jonathan Laruelle, Anne Moncollin, Séverine Mora, Fiorella Nourreddine, Anne-Laure Pierson, Simone Risch, Murielle Ullmann, Audrey Weber, Carole Weber, et tous les autres personnels du Plateau Technique de Microbiologie

pour votre sympathie et nos échanges durant ces trois dernières années.

A Mesdames et Messieurs mes collègues de l'Institut de Virologie, présents, Véronique Christ, Morgane Solis, Eric Soulier, Aurélie Velay et Marie-Josée Wendling, anciens, Heidi Barth, Charlotte Sueur et futurs, Ilies Benotmane,

pour tout ce que nous avons vécu ensemble ces trois dernières années et nos pauses fructueuses et sympathiques.

A Monsieur le Professeur Thibault Mesplède,

pour sa confiance, ses conseils et nos projets canadiens futurs.

A Madame le Docteur Guinevere Lee,

pour son aide précieuse dans l'analyse des séquences, ses conseils avisés et son excellence.

A Madame le Docteur Cindy Barnig,  
pour sa patience et son sérieux dans les mises au point du tri cellulaire.

A Mesdames Pinar Akbas, Josette Bahouka, Eliane Dubuc, Isabelle Galland, Martine Heinrich, Françoise Kauffmann, Valérie Laurent, Eliane Mosack et Cindy Zobel,  
pour nos échanges durant ces dernières années.

A mes parents, qui ont toujours été présents pour moi, dans les bons comme les mauvais moments. Merci pour votre soutien et vos conseils avisés. Voici un projet de plus qui s'achève et plein d'autres qui démarrent.

A ma famille, toujours drôle et toujours là. Aux plus grands, je dis merci pour vos enseignements à l'école de la vie. Aux plus petits, j'espère pouvoir apporter à mon tour aide et soutien.

A mes proches, en particulier, Pierre-André Labolle, Jérôme Klingler, Manuel Pires, Elodie Haven et Gustave,  
pour tous ces moments et ces rires inoubliables, pour votre soutien et votre compréhension.

## Table des matières

|   |           |
|---|-----------|
| Table des matières  | 5         |
| Liste des tableaux  | 8         |
| Liste des figures   | 9         |
| Liste des abbréviations   | 12        |
| <b>Introduction</b>   | <b>15</b> |
| Épidémiologie et prise en charge de l'infection à VIH   | 16        |
| Enjeux actuels de la prise en charge des personnes vivant avec le VIH                             | 17        |
| Caractérisation des réservoirs viraux et problématique de l'étude                                 | 18        |
| <b>Partie 1. Infection à VIH : Physiopathologie, réservoirs et traitements antirétroviraux.21</b> |           |
| <i>I. Primo-infection</i>   | 22        |
| A. Virologie moléculaire et cellulaire  | 22        |
| 1. Caractéristiques de la particule et du génome du VIH   | 22        |
| 2. Cellules cibles  | 25        |
| 3. Cycle viral  | 26        |
| B. Transmission & étapes précoces de l'infection  | 30        |
| C. Clinico-biologie de la primo-infection   | 35        |
| D. Diversité virale et réservoirs en primo-infection  | 36        |
| 1. Généralités sur le réservoir   | 36        |
| 2. Compartiment sanguin   | 40        |
| 3. Le tractus génital masculin  | 46        |
| 4. Le tractus génital féminin   | 47        |
| 5. Le tractus digestif  | 48        |
| <i>II. Infection chronique</i>  | 53        |
| A. Clinico-biologie de la phase chronique   | 53        |
| B. Diversité virale et réservoirs en infection chronique  | 55        |
| 1. Le compartiment sanguin  | 55        |
| 2. Le tractus génital masculin  | 58        |
| 3. Le tractus génital féminin   | 59        |
| 4. Le tractus digestif  | 60        |
| <i>III. Succès virologique sous traitement antirétroviral</i>                                     | 62        |
| A. Principe du traitement antirétroviral  | 62        |

|   |  |            |
|---|--|------------|
| 1.  | Antirétroviraux et objectifs du traitement               | 62         |
| 2.  | Combinaisons antirétrovirales                            | 69         |
| 3.  | Observance du traitement                                 | 76         |
| 4.  | Effets indésirables des antirétroviraux                  | 77         |
| 5.  | Pronostic de l'infection sous traitement antirétroviral  | 80         |
| B.  | Diversité virale et réservoirs sous traitement efficace  | 80         |
| 1.  | Compartiment sanguin                                     | 80         |
| 2.  | Le tractus génital masculin                              | 88         |
| 3.  | Le tractus génital féminin                               | 89         |
| 4.  | Le tractus digestif                                      | 90         |
| IV.   | <i>Échec virologique</i>                                 | 92         |
| A.  | Définitions  | 92         |
| B.  | Échec virologique & résistance                           | 95         |
| 1.  | Problématique de l'archivage des mutations de résistance | 95         |
| 2.  | Détection des résistances du VIH                         | 97         |
| 3.  | Détection des résistances dans l'ADN VIH-1               | 102        |
| C.  | Réservoirs viraux lors de l'échec virologique            | 105        |
| 1.  | Le compartiment sanguin                                  | 105        |
| 2.  | Le tractus génital masculin                              | 107        |
| 3.  | Le tractus génital féminin                               | 107        |
| 4.  | Le tissu digestif  | 108        |
|   | <i>Conclusions et perspectives</i>                       | 109        |
| <b>Partie 2. Etude DRONE : Impact d'un traitement comprenant du dolutegravir sur la dynamique du réservoir viral.</b> |  | <b>110</b> |
|   | <i>Introduction et rationnel scientifique de l'étude</i> | 111        |
| A.  | Définition de la pathologie ou de l'événement étudié     | 111        |
| 1.  | Limites de la prise en charge                            | 112        |
| 2.  | Rationnel pour l'utilisation du dolutegravir             | 113        |
| B.  | Objectifs de l'essai                                     | 116        |
| 1.  | Objectif Principal                                       | 116        |
| 2.  | Objectifs Secondaires                                    | 116        |
| C.  | Conception de la recherche                               | 116        |
| 1.  | Critère d'évaluation principal                           | 117        |

|  |            |
|--|------------|
| 2. Critères d'évaluation secondaires               | 117        |
| D. Population étudiée                              | 118        |
| 1. Critères d'inclusion                            | 118        |
| 2. Critères de non inclusion                       | 119        |
| 3. Promotion de l'étude et considérations éthiques | 120        |
| E. Déroulement pratique de l'essai                 | 120        |
| 1. Modalités de recrutement                        | 120        |
| 2. Description des visites                         | 121        |
| F. Analyses statistiques                           | 122        |
| 1. Description des méthodes statistiques utilisées | 122        |
| 2. Nombre de personnes à inclure et justification  | 123        |
| <i>Article I</i>                                   | <i>125</i> |
| A. Objectifs de l'analyse                          | 126        |
| B. Principaux résultats                            | 126        |
| C. Discussion                                      | 127        |
| <i>Article II</i>                                  | <i>153</i> |
| A. Objectifs de l'analyse                          | 154        |
| B. Principaux résultats                            | 154        |
| C. Discussion                                      | 158        |
| <i>Article III</i>                                 | <i>168</i> |
| A. Objectifs de l'analyse                          | 169        |
| B. Principaux résultats                            | 169        |
| C. Discussion                                      | 173        |
| <i>Conclusions et perspectives</i>                 | <i>188</i> |
| <b>Références</b>                                  | <b>192</b> |
| <b>Annexes</b>                                     | <b>228</b> |



## Liste des tableaux

|   |     |
|---|-----|
| TABLEAU 1. SIGNES CLINICO-BIOLOGIQUES OBSERVABLES LORS D'UNE PRIMO-INFECTION VIH.                         | 36  |
| TABLEAU 2. DESCRIPTIF DES DEUX PRINCIPALES ETUDES DU RESERVOIR VIH EN PRIMO-INFECTION ANALYSEES.          | 40  |
| TABLEAU 3. RESUME DES PRINCIPALES COMBINAISONS THERAPEUTIQUES ETUDIEES DANS LA LITTERATURE.               | 70  |
| TABLEAU 4. LISTE DES MOLECULES ANTIRETROVIRALES COMMERCIALISEES EN FRANCE EN 2017. ADAPTE DE MORLAT 2017. | 71  |
| TABLEAU 5. COMBINAISONS ANTIRETROVIRALES RECOMMANDEES EN PREMIERE INTENTION. ADAPTE DE MORLAT 2017.       | 73  |
| TABLEAU 6. ÉVOLUTION DES COMBINAISONS ANTIRETROVIRALES UTILISEES AU TRAIT D'UNION. ADAPTE DE REY 2017.    | 74  |
| TABLEAU 7 : ETUDES DE PHASE III SUR LES COMBINAISONS INCLUANT LE DTG                                      | 115 |
| TABLEAU 8 : GROUPES D'INCLUSIONS EN FONCTION DU STADE CLINIQUE ET THERAPEUTIQUE DE L'INFECTION A VIH      | 117 |
| TABLEAU 9 : CRITERES SPECIFIQUES A L'INCLUSION DANS LES DIFFERENTS GROUPES DE L'ETUDE                     | 119 |
| TABLEAU 10 : DESCRIPTION DES PROCEDUREES DE L'ESSAI   | 122 |
| TABLEAU 11 : ESTIMATION DU NOMBRE DE PERSONNES A INCLURE  | 124 |

## Liste des figures

|   |    |
|---|----|
| Figure 1. Cartographie du génome du VIH-1 et du VIH-2 et représentation d'un virion VIH-1. Adaptée de Li et al. 2016.   | 24 |
| Figure 2. Cellules cibles du VIH et distribution anatomique. Adaptée de Barton et al. 2016.   | 26 |
| Figure 3. Représentation du cycle viral du VIH-1. Adaptée de Li et al. 2016.  | 29 |
| Figure 4. Représentation du complexe de pré-intégration (PIC)   | 30 |
| Figure 5. Invasion du VIH en primo-infection. Adaptée de Kahn et al. 2018.  | 34 |
| Figure 6. Stadification de la primo-infection selon Fiebig. Adaptée de Cohen et al. 2011.   | 35 |
| Figure 7. Distribution anatomique des réservoirs VIH. Adaptée de Avettand-Fenoel et al. 2016.   | 38 |
| Figure 8. Approches de quantification du réservoir VIH par biologie moléculaire. Adaptée de Lewin et al. 2011.  | 39 |
| Figure 9. Exemple de la dynamique de variants minoritaires sanguins en primo-infection. Adaptée de Kijak et al. 2016.   | 42 |
| Figure 10. Niveau d'ADN-VIH en fonction du stade clinique et thérapeutique lors de l'infection à VIH. Adaptée de Avettand-Fenoel et al. 2016.   | 45 |
| Figure 11. Modélisation de la compartimentalisation du VIH dans le tractus génital masculin à différents stades cliniques et thérapeutiques de l'infection. Adaptée de Gantner et al. 2018. | 50 |
| Figure 12. Modélisation de la compartimentalisation du VIH dans le tractus génital féminin à différents stades cliniques et thérapeutiques de l'infection. Adaptée de Gantner et al. 2018.  | 51 |
| Figure 13. Histoire naturelle de l'infection par le VIH en l'absence de traitement antirétroviral. Adaptée de An et al. 2010.   | 54 |
| Figure 14. Évolution de la quasiespèce virale en l'absence de traitement antirétroviral. Adaptée de Lee et al. 2008.  | 56 |
| Figure 15. Circulation des lymphocytes au travers d'un patch (compartiment). Adaptée de Lythgoe et al. 2016.  | 58 |
| Figure 16. Représentation graphique de la proportion d'ARN viral associé aux cellules de chaque organe. Adaptée de Estes et al. 2017.   | 60 |

|   |     |
|---|-----|
| Figure 17. Représentation de l'étape d'action des antirétroviraux au long du cycle viral. Adaptée de Laskey et al. 2014.  | 63  |
| Figure 18. Résidus importants dans l'interaction II-intégrase.  | 67  |
| Figure 19. Évolution des schémas thérapeutiques utilisés au Trait d'Union au cours du temps. Adaptée de Rey 2017.   | 75  |
| Figure 20. Évolution de la prescription des molécules antirétrovirales utilisées au Trait d'Union au cours du temps. Adaptée de Rey 2017.                             | 76  |
| Figure 21. Modélisation des phases de la décroissance de la virémie plasmatique sous traitement. Adaptée de Palmer et al. 2011.                                       | 81  |
| Figure 22. Dynamique de l'ADN-VIH à la mise sous traitement antirétroviral. Adaptée de Hocqueloux et al. 2013.  | 82  |
| Figure 23. Dynamique du réservoir sous traitement antirétroviral. Adaptée de Finzi et al. 1999.   | 83  |
| Figure 24. Réservoir dans les sous-populations lymphocytaires T CD4+ sous traitement antirétroviral. Adaptée de Chomont et al. 2009 et Chéret et al. 2015.            | 85  |
| Figure 25. Réservoir dans les lymphocytaires T CD4+ polarisés sous traitement antirétroviral. Adaptée de Lee et al. 2017.   | 88  |
| Figure 26. Structure chimique des II, sites de liaisons à l'intégrase et voies de résistance. Adaptée de Wainberg et al. 2015.  | 94  |
| Figure 27. Dynamique des quasiespèces résistantes archivées dans l'ADN-VIH au cours du temps chez des personnes en succès virologique. Adaptée de Gantner et al 2016. | 104 |
| Figure 28. Profil des séquences provirales en pré- et post-interruption thérapeutiques. Adaptée de Clarridge et al 2018.  | 106 |
| Figure 29. Comparatif des niveaux d'ADN-VIH entre J0 et S48 des quatre groupes d'inclusion.   | 129 |
| Figure 30. Dynamique des niveaux d'ADN-VIH entre J0 et S48 dans les quatre groupes d'inclusion.   | 130 |
| Figure 31. Proportions moyennes des sous-populations lymphocytaires par groupe et par visite  | 155 |

|   |     |
|---|-----|
| Figure 32. Quantité d'ADN-VIH dans les sous-populations lymphocytaires par groupe et par visite                           | 156 |
| Figure 33. Contribution des sous-populations lymphocytaires T CD4+ au pool de cellules infectées par groupe et par visite | 157 |
| Figure 34. Arbres phylogénétiques des séquences consensus par patient/visite.   | 170 |
| Figure 35. Dynamique de la diversité génétique des variants archivés dans l'ADN VIH                                       | 172 |
| Figure 36. Dynamique de la diversité génétique des variants archivés dans l'ADN VIH                                       | 174 |

## Liste des abbréviations

ABC : abacavir

ADN : Acide Desoxyribonucléique

AI : *acute infection*

ALAT : Alanine amino transférase

ARN : Acide Ribonucléique

ARNm : ARN messenger

ASAT : Aspartate amino transférase

ATV : atazanavir

AZT : zidovudine

CCD : *core catalytic domain*

CD14s : CD14 soluble

CD163s : CD163 soluble

CI : *Chronic infection*

CMSP : Cellules mononucléées du sang périphérique

CMV : Cytomégalovirus

CPK : Créatine phosphokinase

CTD : *C terminal domain*

CTL : lymphocytes T cytotoxiques

DC-SIGN : *Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing-Non-integrin*

ddI : didanosine

DRV : darunavir

DTG : Dolutegravir

d4T : stavudine

EBV : Epstein-Barr Virus

EFV : efavirenz

ELISA : *enzyme-linked immunosorbent assay*

ETR etravirine

EVG : Elvitegravir

FTC : emtricitabine

fosAPV : fosamprenavir

GALT : *gut associated lymphoid tissue*

HDL : *high density lipoprotein*

HSV : Hépatite Simplex Virus

IDV : indinavir  
IF : Inhibiteur de fusion  
II : Inhibiteur d'intégrase  
IL-6us : Interleukine 6 ultrasensible  
INNTI : Inhibiteur non-nucléosidique de la transcriptase inverse  
INTI : Inhibiteur nucléosidique de la transcriptase inverse  
IP ou IP/r inhibiteur de portéase ou Inhibiteurs de protéase boosté  
IP-10 : *Interferon gamma inducible protein*  
IQR : Interquartile  
LDL : *low density lipoprotein*  
LEDGF/p75 : *lens epithelium-derived growth factor*  
LPV : lopinavir  
LTR : *Long Terminal Repeat*  
MVC : maraviroc  
NPC : *nuclear pore complex*  
NTD : *N terminal domain*  
NVP : nevirapine  
PCR : *polymerase chain reaction*  
PIC : *pre-integration complex*  
qVOA : *quantitative viral outgrowth assay*  
RAL : Raltegravir  
RPV : Rilpivirine  
RTC : *reverse transcriptase complex*  
RTV : ritonavir  
SIDA : Syndrome de l'Immunodéficience Acquise  
SIV : *simian immunodeficiency virus*  
SQV : saquinavir  
TAF : tenofovir alafénamide  
TCM : lymphocyte T CD4+ central mémoire  
TDF : tenofovir disoproxil fumarate  
TEM : lymphocyte T CD4+ effecteur mémoire  
TTM : lymphocyte T CD4+ transitionnel mémoire  
TN : lymphocyte T CD4+ naif  
TPV : tipranavir  
T20 : enfuvirtide

UDS : *ultra-deep sequencing*

VIH : Virus de l'Immunodéficience humaine

VF : *Virological failure*

VS : *Virological success*

3TC : lamivudine.

# Introduction

---



## *Épidémiologie et prise en charge de l'infection à VIH*

L'infection à VIH touche 36,7 millions de personnes dans le monde, dont la majorité réside en Afrique subsaharienne (25,6 millions) [<http://www.who.int/hiv/en/>, données 2016]. En France, on estime que 153400 personnes vivaient avec le VIH en 2013 [Morlat, 2017. Rapport sur la prise en charge des personnes vivant avec le VIH]. Le Trait d'Union, centre de soins de l'infection à VIH aux Hôpitaux Universitaires de Strasbourg compte une file active de 1240 individus en 2016 [Rey, 2017 Rapport d'activité, Le Trait d'Union]. Le nombre de nouvelles infections à VIH en France était estimé à 6000 en 2015 [Morlat, 2017. Rapport sur la prise en charge des personnes vivant avec le VIH], et au Trait d'Union à 51 pour l'année 2016. La transmission sexuelle du virus représente la majorité de ces nouvelles infections, avec 98% à l'échelle nationale et 90% à l'échelle locale de notre centre. Sur les deux types de VIH actuellement décrits, l'infection par le VIH-1 est la plus prévalente à l'échelle nationale alors que l'infection par le VIH-2 est minoritaire (1% des infections à VIH) [Morlat, 2017. Rapport sur la prise en charge des personnes vivant avec le VIH].

Sans traitement, l'infection par le VIH entraîne une immunodépression, par déplétion quantitative et qualitative des lymphocytes T CD4+, les principales cellules cibles de ce virus. En absence de traitement, l'infection à VIH évolue vers le stade SIDA pour syndrome d'immunodéficience humaine acquise avec l'apparition de maladies opportunistes conduisant au décès. D'autre part et toujours en l'absence de traitement, la réplication permanente du virus dans l'organisme s'accompagne également d'une inflammation persistante. Ce syndrome inflammatoire généralisé conduit également à l'apparition de comorbidités, par exemple cardiovasculaires, et à un vieillissement accéléré. Pour résumer, en l'absence de traitement, l'infection à VIH conduit au décès par une double cause de mortalité à la fois SIDA (maladies opportunistes) et non-SIDA (maladies inflammatoires).

Le pronostic de l'infection à VIH a été modifié avec la découverte des thérapies antirétrovirales combinées. Les molécules antirétrovirales sont en général associées en trithérapies incluant des familles à actions pharmacologiques différentes. Ces trithérapies antirétrovirales ciblent différentes étapes du cycle de multiplication du virus, elles permettent donc de réduire la réplication du virus. La prise continue de ces traitements permet d'abaisser la détection du génome contenu dans les particules virales libres du VIH circulant dans le sang en-dessous du seuil des techniques commerciales actuellement utilisées. Ainsi, les traitements antirétroviraux sont utilisés pour stopper la progression de l'infection en

restaurant l'immunité et diminuant l'activation immunitaire généralisée. De ce fait et depuis 2013, en France, il est recommandé d'instaurer un traitement antirétroviral chez toute personne vivant avec le VIH quel que soit son nombre de lymphocytes T CD4+ [Morlat, 2017. Rapport sur la prise en charge des personnes vivant avec le VIH]. Pour résumer, d'une infection mortelle, avec l'utilisation des traitements antirétroviraux combinés, l'infection à VIH est devenue une infection chronique pour laquelle l'espérance de vie est normalisée. En effet, la mortalité des personnes ayant un nombre de lymphocytes T CD4+ > 500/mm<sup>3</sup> depuis plus de 3 ans est similaire à celle des personnes de la population générale [Lewden *et al.*, 2012].

### ***Enjeux actuels de la prise en charge des personnes vivant avec le VIH***

Malgré les avancées, la prise en charge de l'infection doit faire face à plusieurs enjeux. Concernant les thérapies antirétrovirales, leur efficacité est conditionnée par une prise quotidienne stricte de façon à rendre la réplication virale indétectable dans le sang. Une mauvaise observance de la part des personnes sous traitement peut par ailleurs entraîner une inefficacité du traitement et favoriser la sélection de variants viraux résistants au traitement en cours. On peut également noter que, malgré l'amélioration du profil de toxicité de ces molécules pour celles commercialisées récemment, les traitements peuvent générer des effets indésirables à court terme et que leur profil de tolérance à long terme est parfois inconnu. Sur le plan médico-économique, la prise en charge thérapeutique et le suivi clinico-biologique de l'infection à VIH ont également un coût important en terme de santé publique.

Concernant l'efficacité des traitements, il est à noter que la restauration de l'immunité peut être très lente notamment si le nombre de lymphocytes T CD4+ était bas à la prise en charge. De plus, l'action du traitement sur la réduction de l'activation immunitaire ne demeure souvent que partielle. Plusieurs essais ont montré que différents marqueurs inflammatoires demeuraient plus élevés pour des personnes vivant avec le VIH sous traitement que dans la population générale. Enfin, à l'arrêt des traitements antirétroviraux, la réplication du virus est à nouveau effective et la progression de l'infection reprend. Les traitements sont donc des traitements à vie.

Mises ensemble, toutes ces limitations à la prise en charge actuelle sont autant d'arguments aux efforts de recherches fournis pour la mise au point de stratégies curatives de l'infection à VIH. En effet, les traitements antirétroviraux actuels ne permettent pas l'éradication du VIH

d'un organisme puisque ceux-ci agissent uniquement sur la réplication du virus. Pour comprendre pourquoi les traitements antirétroviraux ne suffisent pas à éradiquer le virus il faut se pencher sur la physiopathologie de l'infection à VIH. Le VIH est issu de la famille des *Retroviridae*, famille de virus caractérisés par leur capacité à intégrer le génome dans celui de la cellule hôte. Ainsi, dès les étapes précoces de l'infection par le VIH, le génome de celui-ci est intégré dans le génome des cellules de son hôte [Donahue *et al.* 2013], notamment les lymphocytes T CD4<sup>+</sup>. À ce stade, la cellule peut se trouver dans deux états :

- une phase dite **d'activation** durant laquelle elle exprime le génome viral et produit des particules virales vers le milieu extracellulaire ;
- et une phase dite **de latence** durant laquelle la cellule n'exprime pas de déterminants viraux.

On peut noter que le système immunitaire adaptatif va être en mesure de développer une réponse immunitaire spécifique et efficace contre les cellules activées car elles expriment à leur surface les antigènes viraux qui sont reconnus comme des éléments du non-soi. À l'inverse, les cellules quiescentes n'expriment pas les antigènes viraux et ne sont pas ciblées par le système immunitaire. Par ailleurs, certaines sous-populations de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> ont une demi-vie longue qui leur permet de survivre plusieurs années et une capacité proliférative importante. Combinées, la longue durée de vie des cellules infectées par le VIH et la capacité d'expansion clonale des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> permettent la persistance de l'infection [Strain *et al.* 2003]. L'ensemble des cellules ayant intégré le virus à l'état latent est qualifié de réservoir viral. Le contrôle ou la guérison de l'infection à VIH passera respectivement par la réduction drastique ou l'éradication du réservoir viral [Barouch *et al.* 2014]. La caractérisation et l'étude de stratégies permettant l'élimination du réservoir viral sont donc primordiales [Siliciano *et al.* 2016].

En résumé, malgré les traitements antirétroviraux, l'infection par le VIH ne peut être éradiquée en raison de l'existence d'un réservoir de virus persistant à long terme.

### ***Caractérisation des réservoirs viraux et problématique de l'étude***

En guise de préambule nous rappelons que le cycle de multiplication du VIH comprend une étape d'intégration de l'ARN-VIH rétrotranscrit en ADN-VIH dans le génome humain sous forme de provirus. Cette intégration, à l'origine de la persistance de l'infection par le VIH sous traitement, a lieu dans les cellules cibles du VIH. Ces cellules cibles sont nombreuses,

outre les lymphocytes T CD4+, on peut noter les monocytes-macrophages, les cellules folliculaires dendritiques, les cellules de Langerhans cutanées et les cellules de la microglie cérébrale. La diversité des types cellulaires et leur localisation anatomique variée créent autant de sanctuaires pouvant abriter le VIH.

La caractérisation du réservoir viral est l'objet de nombreuses études. Le réservoir viral a en majorité été étudié sur des prélèvements sanguins. Les autres compartiments, plus difficiles à aborder, sont ainsi moins bien caractérisés. Plusieurs techniques ont été utilisées pour la caractérisation du réservoir. Parmi les plus utilisées on peut noter :

- les techniques de quantification du réservoir par des techniques de biologie moléculaire ou de culture cellulaire à partir d'échantillons de personnes infectées par le VIH ;
- les techniques de séquençage qui permettent d'en apprécier la qualité et la diversité génétique ;
- les techniques de tri cellulaire qui permettent une analyse fine des sous-populations cellulaires infectées.

Ces différentes études nous ont principalement appris que :

- la quantité de réservoir viral diminue très lentement sous traitement antirétroviral ;
- la qualité des séquences virales intégrées dans le génome humain varie ;
- les différentes sous-populations de cellules hôtes et les différents compartiments anatomiques n'hébergent pas tous le virus de manière égale [Chomont *et al.* 2009].

La caractérisation du réservoir viral est donc complexe et la composition du réservoir semble influencée par le traitement antirétroviral. Cette caractérisation est d'autant plus compliquée que chaque personne vivant avec le VIH est différente, notamment en terme de :

- son histoire clinique de l'infection à VIH ;
- son passé thérapeutique.

Partant de ces postulats nous avons souhaité **évaluer l'impact du statut clinique et thérapeutique de l'infection à VIH sur la dynamique du réservoir viral**. Notre hypothèse est que l'instauration d'un nouveau traitement antirétroviral n'affecte pas de la même façon la quantité et la qualité du réservoir VIH chez des personnes :

- en primo-infection, naïves de traitement antirétroviral ;
- en infection chronique, naïves de traitement antirétroviral ;
- en succès virologique sous un autre traitement antirétroviral ;
- en échec virologique sous un autre traitement antirétroviral.

Nous avons donc mené une étude incluant des personnes vivant avec le VIH issues de ces quatre groupes débutant un même traitement antirétroviral. La combinaison antirétrovirale choisie incluait obligatoirement une molécule antirétrovirale nommée dolutegravir (ou DTG), un inhibiteur de l'intégrase. Cette molécule a été choisie car elle correspondait à la molécule la plus récente mise sur le marché avant le début de l'étude, avec également deux points d'intérêts :

- une puissance élevée signifiant une capacité élevée à réduire la réplication virale ;
- une barrière génétique élevée signifiant une robustesse au développement des résistances à son encontre (et donc à leur archivage dans le réservoir viral).

Après cette rapide contextualisation, nous allons à présent, dans une première partie, décrire la physiopathologie de l'infection par le VIH, la dynamique des réservoirs viraux et l'impact d'un traitement antirétroviral sur ces processus. Dans une seconde partie nous allons rapporter les résultats de notre analyse de la dynamique des réservoirs viraux chez des personnes traitées par inhibiteur de l'intégrase. Ces résultats ont donné lieu à trois articles ; le premier rapporte l'analyse quantitative du réservoir VIH sanguin ainsi que de l'activation immune sous traitement par inhibiteur de l'intégrase, le deuxième est une étude plus fine de ces réservoirs au niveau des sous-populations lymphocytaires T CD4+, et le troisième rapporte l'analyse de la variabilité génétique des quasiespèces virales archivées dans les cellules sanguines.

# Partie 1. Infection à VIH : Physiopathologie, réservoirs et traitements antirétroviraux.

---

Cette première partie a pour objectif de rappeler les généralités de la physiopathologie de l'infection par le VIH et de l'impact des traitements antirétroviraux sur la morbi-mortalité de l'infection. Ces rappels sont présentés en quatre sous-parties qui correspondent à quatre stades clinico-thérapeutiques de l'infection par le VIH :

- la primo-infection ;
- l'infection chronique ;
- le succès virologique sous traitement antirétroviral ;
- l'échec virologique sous traitement antirétroviral.

Le choix de cette organisation nous permet également d'introduire les quatre groupes d'inclusion de l'étude menée dans le cadre de la présente thèse. De plus, afin de replacer le contexte des résultats présentés en seconde partie, un accent particulier sera mis sur les principales études ayant caractérisé les réservoirs VIH pour chacun de ces stades clinico-thérapeutiques. De même, les essais ayant étudié la classe antirétrovirale des inhibiteurs de l'intégrase et son impact sur les réservoirs VIH seront détaillés.

## I. Primo-infection

La primo-infection correspond à la première phase clinique suivant la contamination par le VIH. Sa durée est de 3 à 6 mois à partir du jour du contagement. Cette phase correspond à l'entrée du virus dans l'organisme et sa dissémination vers ses différentes cellules et ses différents organes cibles.

Pour comprendre cette étape précoce de l'infection, nous allons brièvement décrire la structure du VIH et son cycle répliatif. Puis, à l'échelle cellulaire et organique, nous allons revoir la dissémination du virus et la clinique correspondante. Enfin, nous présenterons l'installation des réservoirs viraux en primo-infection.

### A. Virologie moléculaire et cellulaire

#### 1. Caractéristiques de la particule et du génome du VIH

Le VIH est un rétrovirus appartenant à la sous-famille des lentivirus, caractérisée par une longue période d'incubation (2 à 10 semaines). Les rétrovirus se distinguent par la présence de la transcriptase inverse, enzyme virale responsable de la rétro-transcription (ou transcription inverse) de leur génome d'ARN en ADN. Ainsi, l'ADN viral est intégré sous forme de provirus dans le génome de la cellule hôte. Le provirus est stable et se réplique grâce à la machinerie cellulaire en même temps que l'ADN de l'hôte.

Sur le plan évolutif, les rétrovirus sont générateurs de diversité, du fait des fréquentes erreurs commises lors de la rétro-transcription [Hu *et al.* 2012] et de leur forte répliation. Par ailleurs, le cycle répliatif de ces virus est caractérisé par une étape d'intégration dans le génome de l'hôte [Craigie *et al.* 2012]. On peut distinguer deux types de VIH de par leurs origines évolutives ; le VIH-1 dérive d'un SIV, pour *simian immunodeficiency virus*, de chimpanzé [Peeters *et al.* 2014] alors que le VIH-2 dérive d'un SIV de singe vert mangabey [Visseaux *et al.* 2016]. L'infection par le VIH-1 est la plus prévalente à l'échelle mondiale.

Le virus se présente en microscopie électronique sous forme d'une particule sphérique de 80 à 120 nm, comportant une enveloppe lipidique et une nucléocapside excentrée et cylindrique.

La nucléocapside contient : le génome viral, les protéines qui assurent la cohésion de la structure et les protéines dont la fonction enzymatique est nécessaire à la réplication virale.

Le génome du VIH mesure environ 9 kb, et se compose de deux copies d'ARN simple brin de polarité positive. Les deux extrémités du génome sont bordées par des séquences nucléotidiques répétées, les LTR pour *Long Terminal Repeat*. Ces séquences sont importantes pour la transcription du génome proviral, notamment pour la fixation de facteurs de transcription [Karn 2012].

Sa structure sous forme LTR-gag-pol-env-LTR est commune à tous les rétrovirus et est très similaire entre VIH-1 et VIH-2 (Figure 1A et 1B). Les gènes viraux sont au nombre de neuf et codent pour 15 protéines [Li 2016].

Les neuf gènes peuvent être divisés en trois classes :

- (1) les gènes codant pour les protéines de structure (*gag, pol et env*) : *gag* (**g**roup-specific **a**ntigen) pour les protéines de la capside et la matrice ainsi que les protéines associées à l'ARN viral, *pol* (**p**olymerase) pour les enzymes telles la protéase, la transcriptase inverse et l'intégrase, puis *env* pour les glycoprotéines de l'**e**nveloppe virale (gp120 et gp41).
- (2) les gènes codant pour les protéines régulatrices (*tat, rev et nef*) : *tat* pour **t**rans-**a**ctivateur de **t**ranscription, *rev* pour **r**égulateur de l'expression des protéines **v**irales et *nef* pour **n**egative regulation **f**actor.
- (3) les gènes codant pour des protéines accessoires (*vpu/vpx, vpr et vif*) : non indispensables à la réplication virale mais nécessaires à la maturation et au relargage des particules virales infectieuses.



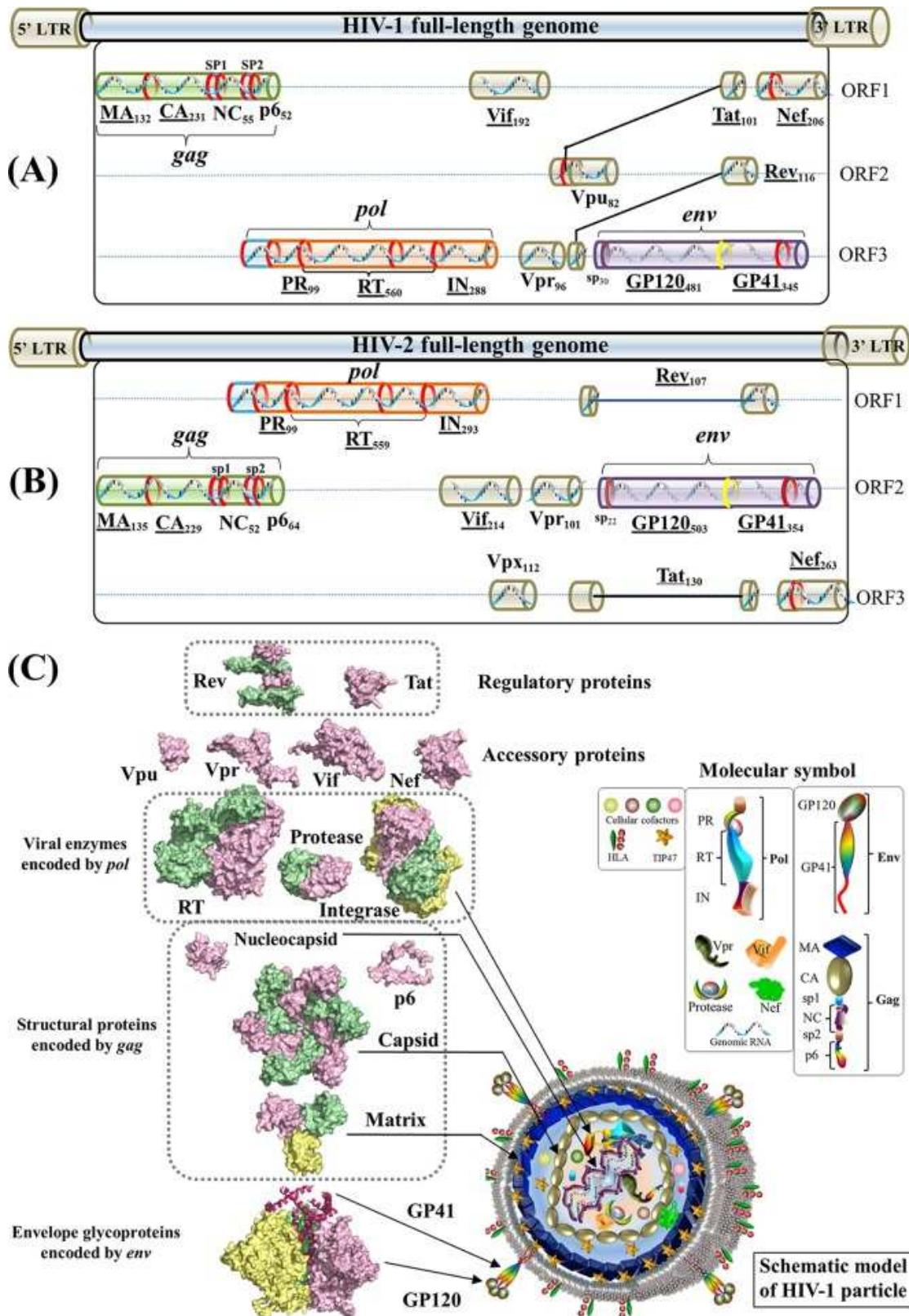


Figure 1. Cartographie du génome du VIH-1 et du VIH-2 et représentation d'un virion VIH-1. Adaptée de Li et al. 2016.

Les génomes du VIH-1 (A) et du VIH-2 (B) codent chacun pour 15 protéines et permet la formation de virions infectieux (C).

## 2. Cellules cibles

La capacité du VIH-1 à infecter une cellule dépend de l'état d'activation de la cellule, du niveau d'expression des récepteurs et corécepteurs d'entrée du VIH-1, et du tropisme de la souche virale. En effet, la gp120 de la particule virale doit reconnaître le récepteur CD4 et un corécepteur (CCR5 et/ou CXCR4) [Wilén 2012 ; Melikyan 2014]. Ainsi, les types cellulaires qui expriment à la fois le récepteur CD4 et un corécepteur sont les cellules cibles du virus.

On retrouve donc, comme cellules cibles du VIH (Figure 4) [Barton *et al.* 2016] :

- les lymphocytes T CD4+ (CD4+, CCR5+, CXCR4+)
- les monocytes/macrophages (CD4+, CCR5+)
- les cellules folliculaires dendritiques (CD4+, CCR5+, CXCR4+)
- les cellules microgliales (CD4+, CCR5+)
- les astrocytes (CCR5+, CXCR4+)
- les cellules NK pour *natural killer* (CD4+, CCR5+, CXCR4+)

Les principales cellules cibles du virus sont les lymphocytes T CD4+ et les monocytes/macrophages [Barton *et al.* 2016]. Ces cellules sont présentes dans tout l'organisme. Différentes sous-populations de lymphocytes T CD4+ existent et expriment plus ou moins les récepteurs et co-récepteurs du VIH à leur surface. Ainsi, les niveaux d'infection de ces cellules sont variables d'une sous-population à l'autre [Lee *et al.* 2016].

Les cellules folliculaires dendritiques sont également sensibles à l'infection et sont présentes dans les ganglions lymphatiques. Dans le système nerveux central, les cellules microgliales qui coexpriment CD4 et CCR5 sont également le siège d'une multiplication virale locale. L'infection des astrocytes par le VIH est controversée [Liu 2004 ; Boutet 2001] ; en effet, ces cellules n'expriment pas le CD4. Ainsi, des mécanismes d'entrée du virus n'utilisant pas le CD4 sont envisagés comme l'utilisation de la protéine hMR pour *human mannose receptor* [Liu 2004].

Une sous-population de cellules NK exprime CD4, CCR5 et CXCR4 [Valentin 2003 ; Bernstein 2009] et sont donc susceptibles d'être infectés.

On peut également noter que les cellules dendritiques expriment une lectine de type C appelée DC-SIGN pour *Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing-Non-integrin*, qui permet de reconnaître le virus par sa gp120 et de l'internaliser [Geijtenbeek 2000].

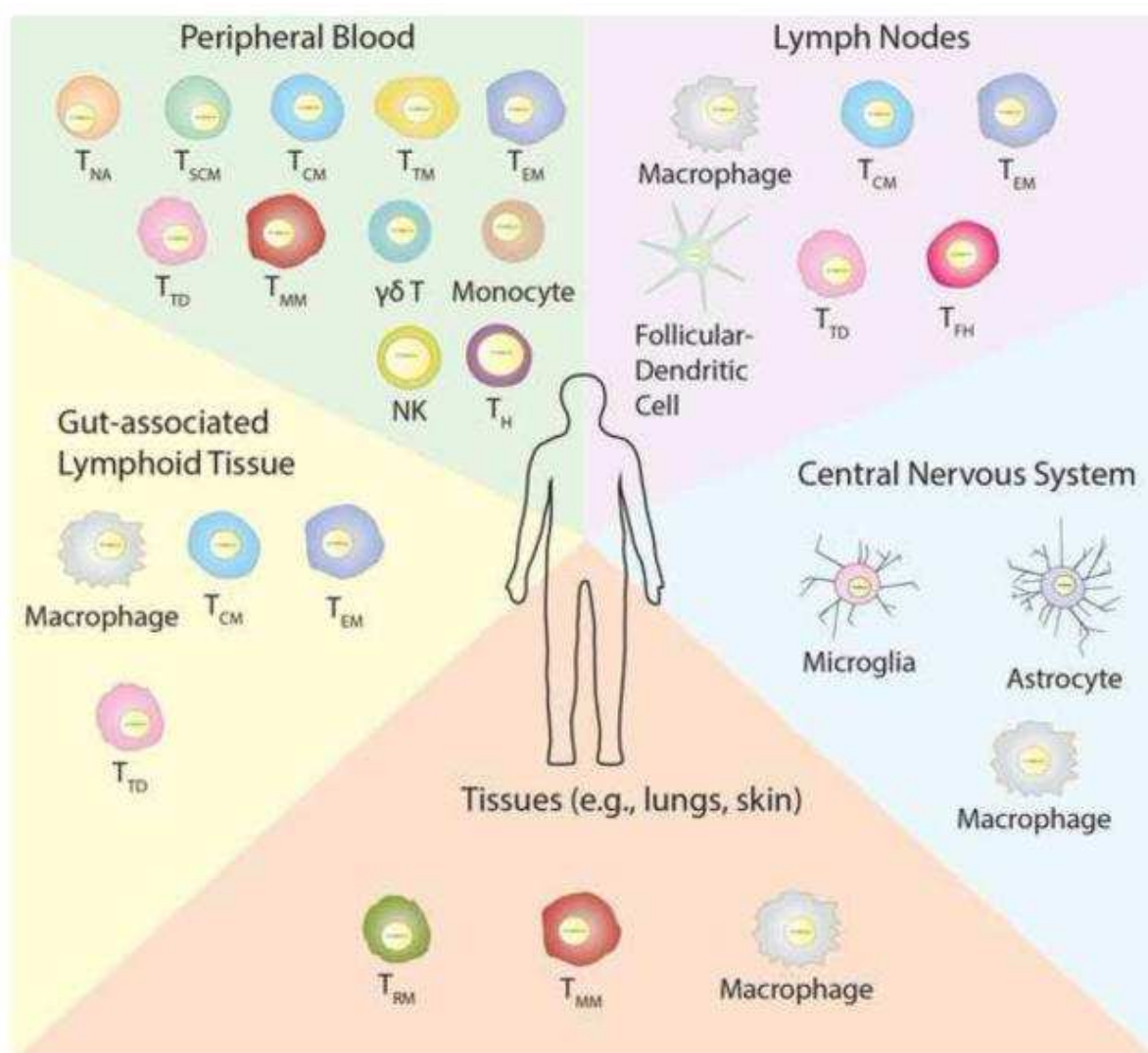


Figure 2. Cellules cibles du VIH et distribution anatomique. Adaptée de Barton et al. 2016.

Les principales cellules cibles du VIH sont les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et les macrophages. Ces cellules sont retrouvées dans différents compartiments anatomiques. On peut également noter que les cellules NK, les cellules folliculaires dendritiques, les cellules microgliales et les astrocytes peuvent également être infectées par le VIH.

### 3. Cycle viral

Dans les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> activés, la durée du cycle de réplication virale est estimée à 2 jours [Perelson 1996]. Le cycle viral peut être décomposé en neuf étapes (Figure 3) :

(1) l'entrée virale. Lors de cette première étape, la particule virale mature vient se fixer sur sa cellule cible par la gp120 virale aux récepteurs CD4 et aux corécepteurs des chémokines (CCR5 et CXCR4) [Wilén *et al.* 2012 ; Melikyan *et al.* 2014]. L'attachement engendre une modification de la conformation de la gp41 qui permet la fusion des membranes cellulaires. La capsid virale est alors libérée dans le cytoplasme. Les virions infectieux peuvent également entrer dans la cellule par la voie de l'endocytose (étape (9) sur la Figure 3) [Permanyer *et al.* 2010].

(2) la rétro-transcription. Le génome viral sous sa forme ARN est associé à la transcriptase inverse et à d'autres protéines au sein d'un complexe appelé RTC pour *reverse transcriptase complex*. L'ARN viral y est rétrotranscrit en un double brin d'ADN [Hu *et al.* 2012].

(3) l'intégration virale. Après la retro-transcription, le RTC est réorganisé en PIC pour *pre-integration complex* dans le cytoplasme. La composition exacte du PIC n'est pas consensuelle, mais comprend des protéines virales, cellulaires et l'ADN viral double brin linéaire (Figure 4) [Ambrose *et al.* 2014]. L'intégration du génome viral comprend plusieurs étapes. La première étape consiste en une activité de 3'-processing, c'est-à-dire que l'intégrase, alors sous forme tétramérique, enlève deux nucléotides à chaque extrémité 3' du double brin d'ADN viral. Un groupement hydroxyle ainsi dégagé interagit avec l'ADN de la cellule hôte [Engelman *et al.* 2008]. La deuxième étape consiste en l'import nucléaire du PIC. Ceci se fait par les pores nucléaires par les pores nucléaires ou NPC pour *nuclear pore complex* [Engelman *et al.* 2008]. Lors de cette étape, et à partir du double brin d'ADN non-intégré, une transcription pré-intégration a lieu permettant la synthèse de trois protéines virales, Rev, Tat et Nef [Sloan *et al.* 2011]. La troisième étape consiste en la localisation du PIC au niveau du chromosome humain dans un domaine activement transcrit [Craigie *et al.* 2012]. C'est ensuite l'intégrase virale en présence d'un cofacteur cellulaire essentiel, LEDGF/p75 pour *lens epithelium-derived growth factor*, qui permet la formation de jonctions entre les séquences répétées LTR de l'ADN-VIH et de l'ADN cellulaire [Craigie *et al.* 2012]. L'intégration ou la persistance des formes intégrées semble avoir lieu prioritairement à proximité de pro-oncogènes, et joue un rôle dans l'expansion clonale des cellules infectées [Maldarelli 2014]. La quatrième étape est le transfert de brin. L'ADN viral est inséré dans l'ADN cellulaire par la réaction de transfert de brin [Engelman *et al.* 2008]. La dernière étape consiste en la réparation des jonctions ainsi formées par des cofacteurs cellulaires [Craigie *et al.* 2012].

(4) la transcription virale. Les protéines virales Tat et Nef détournent la machinerie cellulaire transcriptionnelle pour synthétiser des ARN messager (ARNm) à partir de l'ADN proviral

intégré [Karn *et al.* 2012]. Tat permet par exemple le recrutement de facteurs facilitant l'élongation tels que les histones acétyltransférases et le complexe *positive transcription elongation factor b* (p-TEFB). La protéine Rev recrute des protéines cellulaires pour exporter les ARNm dans le cytoplasme [Rausch *et al.* 2015].

(5) la traduction virale. Les ARNm viraux sont traduits en précurseurs dans différents compartiments cellulaires. Les ARNm de Gag, GagPol, Vif, Vpr, Nef, Tat et Rev sont traduits en polysomes cytosoliques, hormis Env et Vpu [Sundquist *et al.* 2012]. Dans le cytoplasme, la forme mature de Vpr interagit avec des protéines cellulaires (DCAF1 et SLX4) pour induire l'arrêt du cycle cellulaire en phase G2/M [Laguette *et al.* 2014 ; Rice *et al.* 2015]. Vif active la dégradation des protéines APOBEC3 [Albin *et al.* 2010 ; Sakai *et al.* 2006]. Nef a plusieurs fonctions dans différents compartiments cellulaires et en interaction avec diverses protéines cellulaires [Foster *et al.* 2008]. Dans le réticulum endoplasmique, l'ARNm de Vpu est traduit et les protéines matures de Vpu interagissent avec le CD4 nouvellement synthétisé et le retiennent [Magadan *et al.* 2012]. Le CD4 est ensuite dégradé par la voie lysosomale ou la voie du protéasome [Magadan *et al.* 2012 ; Van Damme *et al.* 2008]. De même, Vpu cible la tétherine qui est dégradée de la même manière que le CD4 [Iwabu *et al.* 2009]. La synthèse et la maturation du précurseur protéique Env se font dans le réticulum endoplasmique [Haim *et al.* 2013]. Dans l'appareil de Golgi, les protéases cellulaires clivent le précurseur en gp120 et gp41 qui sont assemblées de façon non covalente en hétéro-dimère [Wyatt *et al.* 1998]. Peu de protéines Env parviennent à la membrane cellulaire, en raison d'un important taux de dégradation dans le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi [Santos da Silva *et al.* 2013]. Les protéines Env, Vpr, Tat et Nef sont apportées à la membrane cellulaire via la voie sécrétoire [Sundquist *et al.* 2012].

(6) assemblage et bourgeonnement. Les nouveaux virions sont assemblés à partir de deux copies d'ARN génomique viral, des protéines virales (Gag, GagPol, Env, Vif, Vpr et Nef) et de cofacteurs cellulaires [Sundquist *et al.* 2012]. Les particules virales s'assemblent et quittent la cellule par bourgeonnement [Sundquist *et al.* 2012]. Nef induit la dégradation du CD4 pour empêcher l'interaction Env-CD4 à la surface de la particule virale [Foster *et al.* 2008]. Les virions peuvent également quitter la cellule par les voies de l'exocytose (étape (8) sur la Figure 3) [Wu *et al.* 2006].

(7) maturation de la particule virale. La protéase virale clive les précurseur Gag et GagPol en protéines structurales (matrice, capsid, nucléocapsid et p6) et non-structurales (protéase, transcriptase inverse et intégrase). Les virions immatures deviennent alors matures et ce

réarrangement structural rend la particule virale infectieuse [Sundquist *et al.* 2012 ; Bell *et al.* 2013].

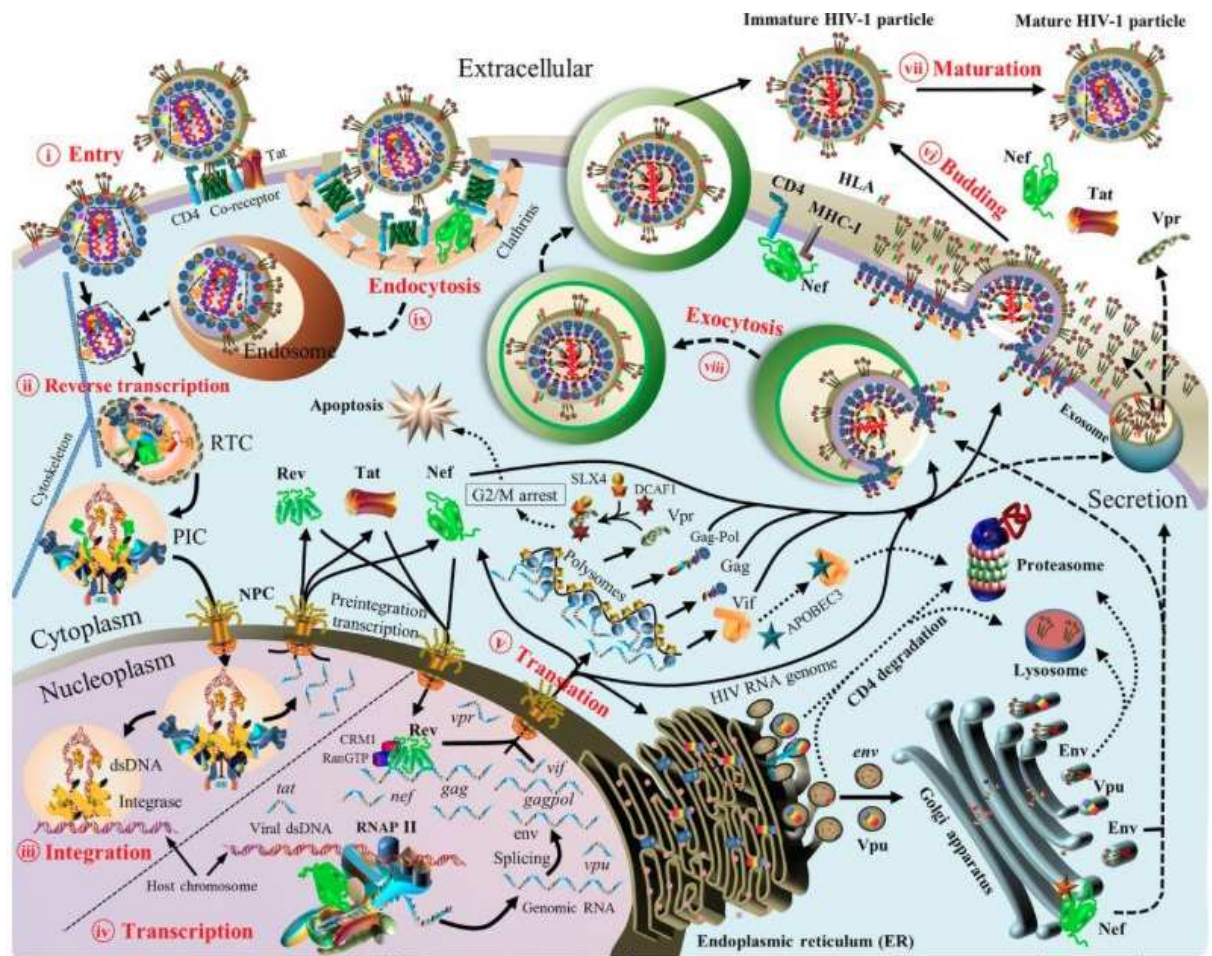


Figure 3. Représentation du cycle viral du VIH-1. Adaptée de Li *et al.* 2016.

Le cycle viral peut être décomposé en neuf étapes : (i) l'entrée virale, (ii) la rétro-transcription, (iii) l'intégration virale, (iv) la transcription virale, (v) la traduction virale, (vi) assemblage et bourgeonnement, (vii) maturation de la particule virale, et deux étapes correspondent respectivement à des voies alternatives (viii) de sortie par exocytose et (ix) d'entrée par endocytose.

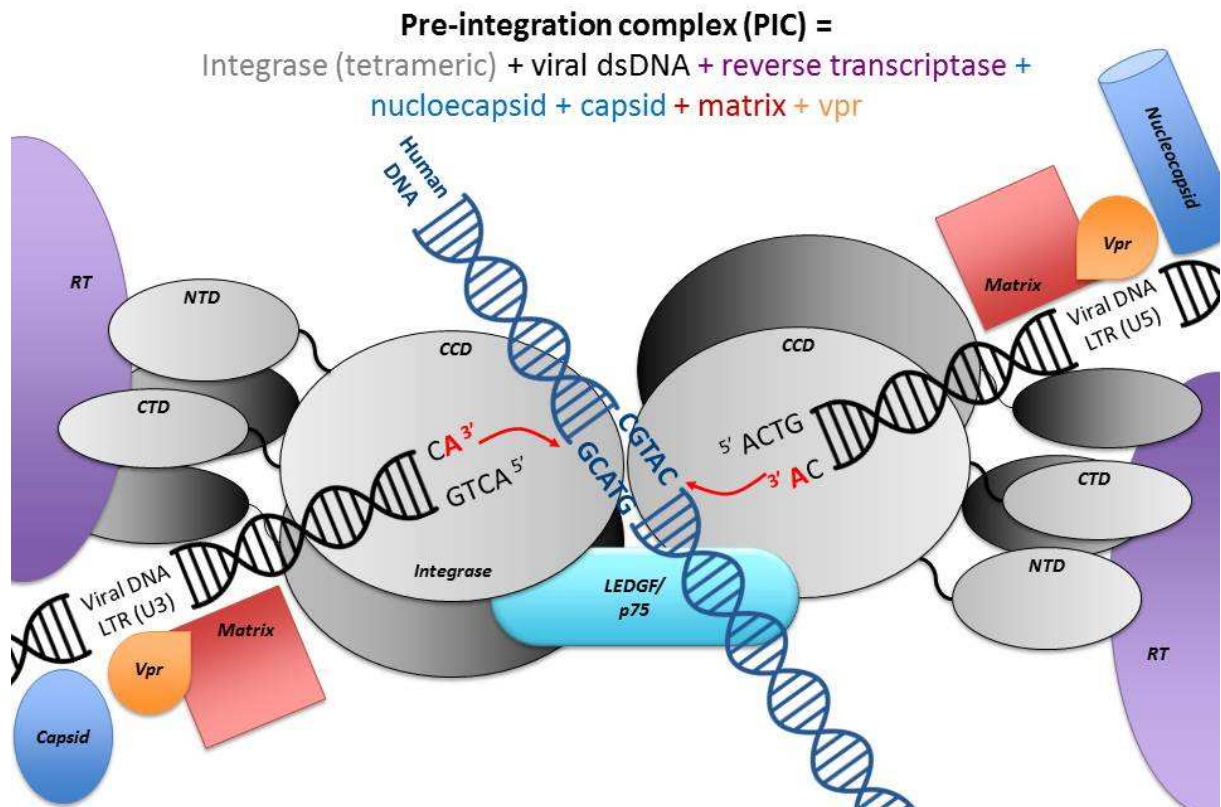


Figure 4. Représentation du complexe de pré-intégration (PIC)

Le complexe de pré-intégration (PIC) comprend l'intégrase sous forme tétramérique. Le domaine catalytique de l'intégrase (CCD) catalyse l'étape de 3'-processing et de transfert de brin. Les domaines N-(NTD) et C-(CTD)-terminaux interagissent avec l'ADN viral, l'ADN cellulaire et la transcriptase inverse. Les autres composants viraux du PIC sont, l'ADN viral, la transcriptase inverse (RT), des protéines structurales (matrice, capside et nucléocapside) et Vpr. Après l'étape de 3'-processing, le PIC est localisé au niveau du génome humain par le cofacteur cellulaire LEDGF/p75, et la réaction de transfert de brin peut avoir lieu.

## B. Transmission & étapes précoces de l'infection

La majorité des infections par le VIH-1 surviennent après une exposition sexuelle. Dans notre centre, une transmission sexuelle est notée pour 82,5% des 1240 patients que compte la file active en 2016 [Rapport d'activité, Le Trait d'Union, 2016]. Ce chiffre est de 90% pour les 51 personnes dépistées au courant de l'année 2016. Dans ce contexte de contamination par voie sexuelle, l'entrée du virus peut se faire via les muqueuses génitale, rectale ou orale [Vernazza *et al.* 1999]. La probabilité de transmission par acte sexuel est faible [Varghese *et al.* 2002].

À ce jour, des études chez le singe, *in vitro* et *in situ* chez l'homme ont permis d'analyser les premiers mécanismes de transmission et d'entrée du virus (Figure 5) [Haase *et al.* 2011 ; Dezzutti *et al.* 2013].

Deux possibilités d'entrée du SIV ou du VIH au niveau des muqueuses génitale et anale semblent coexister : sous forme de particules virales ou sous forme de cellules infectées en capacité de produire des virions infectieux [Bernard-Stoecklin *et al.* 2013]. Dans le sens de la transmission homme/femme, le virus est alors au contact du mucus cervicovaginal. La qualité et la quantité de ce mucus peuvent ralentir sa diffusion vers l'épithélium [Lai *et al.* 2009 ; Carias *et al.* 2013 ; Shukair *et al.* 2013]. Le mucus colorectal sert également de barrière aux virions infectieux en bloquant l'accès au récepteur DC-SIGN présent sur les cellules dendritiques [Stax 205]. Par ailleurs, la transmission du VIH est plus fréquente si la muqueuse génitale est lésée par un traumatisme physique ou la présence d'une infection génitale [Draughon *et al.* 2012].

En primo-infection après une exposition sexuelle, le VIH traverse l'épithélium muqueux par l'un des mécanismes suivants : la transcytose, capture par les cellules épithéliales ou dendritiques, ou l'exposition directe des cellules sous-épithéliales par des lésions dans la barrière muqueuse [Pope *et al.* 2003].

Concernant les facteurs facilitant du passage épithélial du virus, dans l'appareil génital féminin, l'épithélium de l'endocol (monocouche) semble être plus facilement traversé par le VIH que les épithéliums multicouches de l'exocol et du vagin. Cependant cette barrière épithéliale varie au cours du cycle menstruel et en réponse à la prise d'hormones féminines comme la progestérone. Une inflammation préexistante liée, par exemple, à d'autres infections sexuellement transmissibles et certains microbicides comme le nonoxynol-9 cause des micro ulcérations et une rupture de l'intégrité de l'épithélium qui favorisent le passage du virus. Une ectopie cervicale et une vaginose bactérienne ont également été associées à un risque augmenté d'acquisition du VIH.

Dans le cadre d'un épithélium intact, il existe plusieurs modes de traversée de l'épithélium :

- la transcytose correspond à un passage vésiculaire vers les cellules sous-épithéliales ;
- la capture sélective de variants tropiques R5 et le transfert de ces variants aux cellules sous-épithéliales exprimant le corécepteur CCR5 ;



- la capture par les cellules dendritiques qui sont positionnées dans ou sous l'épithélium et qui projettent leurs dendrites vers la surface du lumen pour attraper les agents pathogènes. Les cellules dendritiques expriment CD4, CCR5, DC-SIGN et d'autres lectines de type C qui permettent la capture des virions. Différentes sous-populations de cellules dendritiques expriment différentes lectines de type C pour assurer capture et dissémination des pathogènes ;
- les lymphocytes T CD4+ intra-épithéliaux sont également exposés directement au virus.

Globalement, le virus est pris en charge par les cellules dendritiques sous-épithéliales (via DC-SIGN) qui le projettent à travers l'épithélium muqueux [Haase *et al.* 2011, Dezzutti *et al.* 2013].

Une fois passé l'épithélium muqueux, les virions ou les cellules transportant le virus vont être au contact des cellules de la *lamina propria* du vagin ou du rectum. Au cours de la primo-infection, le virus présente un tropisme accru pour les cellules exprimant le corécepteur CCR5 [Cohen *et al.* 2011] ; il va infecter localement quelques cellules, à savoir les lymphocytes T CD4+ de types transitionnels/effecteurs mémoires quiescents ou subactivés [Li *et al.* 2005] exprimant des niveaux suffisants du corécepteur CCR5 [Poles *et al.* 2001], les macrophages et les cellules dendritiques [Zhang *et al.* 2004]. Les virus de tropisme X4 peuvent infecter les cellules T CD4+ quiescentes qu'elles soient naïves ou mémoires [Sallusto *et al.* 1999]. Cette préférence d'utilisation du corécepteur CCR5 en primo-infection est retrouvée sur les souches transmises dans le plasma. En effet, la détection de variants viraux à tropisme pour le CXCR4 est retrouvée chez environ 5% des personnes en primo-infection [Raymond *et al.* 2013, Bon *et al.* 2015].

Dans différents modèles d'explants cervicaux, il a été montré que les premières cellules directement sous l'épithélium à être infectées par le VIH sont les cellules dendritiques, les macrophages et les lymphocytes T CD4+ en 24 à 72 heures [Dezzutti *et al.* 2013].

La transmission du virus porté par les cellules dendritiques aux lymphocytes T CD4+ est notamment favorisée par les lectines de type C et la formation de synapses virologiques avec les lymphocytes T CD4+ adjacents, en une heure [Pope *et al.* 2003]. Ce mode de transmission facilite la dissémination aux lymphocytes T CD4+, en particulier les lymphocytes mémoires

qui semble être la sous-population la plus productive *in vivo*. Les virions produits ou portés par les lymphocytes T CD4+, les cellules dendritiques et les macrophages vont être drainés jusqu'aux ganglions lymphatiques proches et disséminer l'infection. L'infection peut donc être, dans un premier temps, localisée au niveau de la porte d'entrée du virus ou bien disséminée rapidement vers les ganglions. Le cheminement du virus vers les ganglions lymphatiques à proximité met environ 48 heures. Les principaux organes infectés ensuite sont les organes lymphoïdes secondaires ou périphériques (ganglions, rate, tissus lymphoïdes des muqueuses intestinales et pulmonaires) [Estes *et al.* 2017].

Les ganglions sont le lieu de rencontre des antigènes et des cellules du système immunitaire pour l'établissement des réponses immunes. Les études menées ont montré que l'activation des lymphocytes T CD4+ infectés dans les ganglions conduit à une amplification majeure de la production virale [Estes *et al.* 2017]. L'hyperplasie folliculaire et l'activation immune intense conduit à un rapide dépassement des centres germinatifs du tissu lymphocytaire folliculaire [Hong *et al.* 2014]. Les organes lymphoïdes primaires (thymus, moelle osseuse) et les organes lieu de résidence des différentes cellules immunitaires (système nerveux central, tractus génital, foie) sont également rapidement infectés [Klein *et al.* 2017 ; Sturdevant *et al.* 2012 ; Suzuki *et al.* 2005]. À cette phase, une forte déplétion du nombre de lymphocytes T CD4+ (>60%) dans le sang et les tissus est notée [Matrajt *et al.* 2014], particulièrement dans le tissu lymphoïde digestif ou GALT pour *Gut Associated Lymphoid Tissue* [Deleage *et al.* 2016].

Les niveaux de virémie sont variables en primo-infection [Stekler *et al.* 2004]. Les personnes dépistées avant la séroconversion ont en général un ARN-VIH supérieur 500.000 copies/mL de plasma sanguin. Avec le développement de la réponse immunitaire CD8 cytotoxique, la virémie décroît jusqu'à atteindre un niveau d'équilibre production/destruction des particules virales au bout de 31 jours après le pic de virémie. Le niveau d'équilibre varie en fonction des individus et dépend principalement du pic de virémie [Robb *et al.* 2016]. Le niveau d'équilibre est un facteur pronostic à long terme de l'infection. Les symptômes de primo-infection apparaissent un peu avant le pic de virémie et persistent jusqu'à celui-ci environ. Bien que les symptômes de primo-infection cessent en général une fois l'équilibre atteint, la quantité de particules virales produites par jour est importante ( $10^{10}$  virions par jour) [Stekler *et al.* 2004].

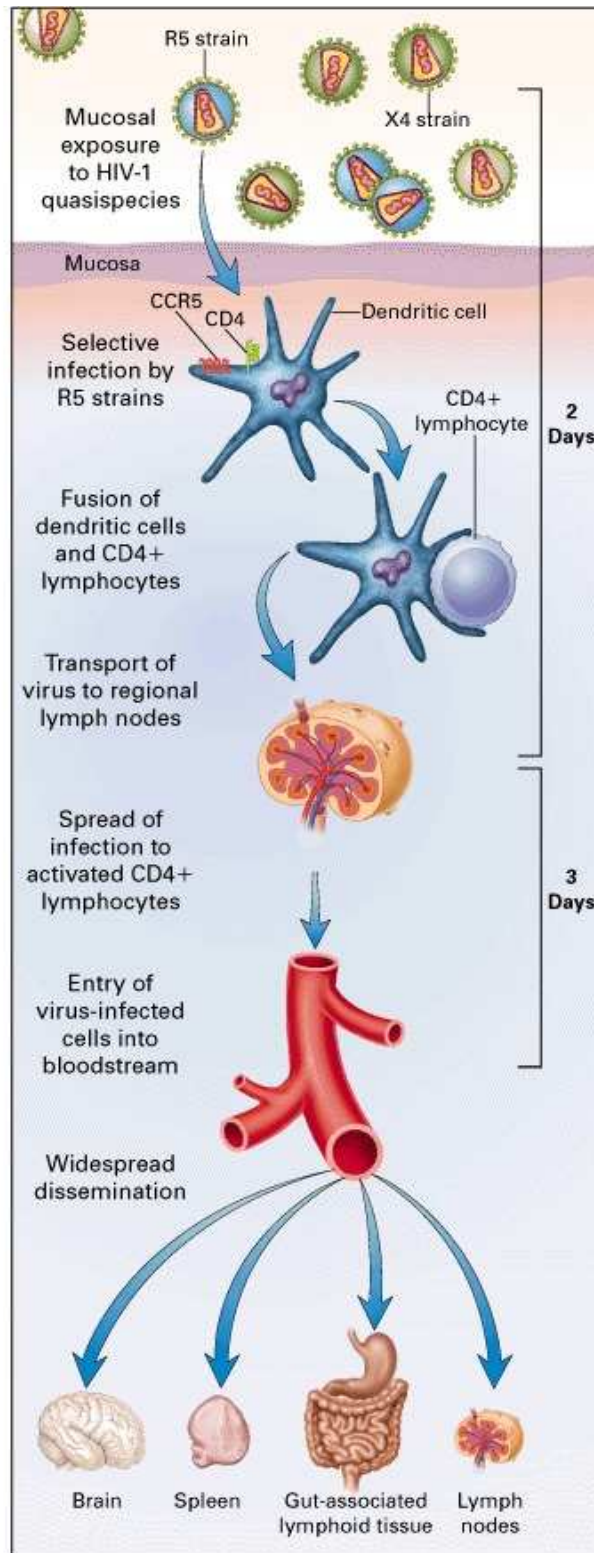


Figure 5. Invasion du VIH en primo-infection. Adaptée de Kahn et al. 2018.

Après un passage muqueux du VIH et la prise en charge par les cellules dendritiques, le virus est présenté à ses cellules cibles, notamment les lymphocytes T CD4+ dans les ganglions lymphatiques en 48 heures. Dans les jours qui vont suivre, le virus va disséminer par voie hémotogène dans ses autres organes cibles.

### C. Clinico-biologie de la primo-infection

Du point de vue biologique, la primo-infection est décomposée en plusieurs stades selon la classification de Fiebig. Cette classification est basée sur la chronologie de positivation de différents marqueurs directs et indirects de l'infection virale (Figure 6). Après une phase d'éclipse d'environ une semaine durant laquelle aucun marqueur de l'infection ne peut être détecté, les différents marqueurs vont devenir détectables les uns après les autres dans l'ordre chronologique suivant :

- (i) ARN-VIH positif,
- (ii) Ag p24 positif,
- (iii) sérologie positive,
- (iv) western blot indéterminé,
- (v) western blot positif avec p31 négative
- et (vi) western blot positif avec p31 positive.

Les derniers stades de cette classification se différencient donc uniquement par la détection des anticorps dirigés contre la protéine p31 du virus à savoir l'intégrase. Le stade (v) de la classification de Fiebig correspond au stade le plus long (de 1 à 3 mois après le contage) ; il est également celui auquel on détecte le plus fréquemment les personnes en primo-infection.

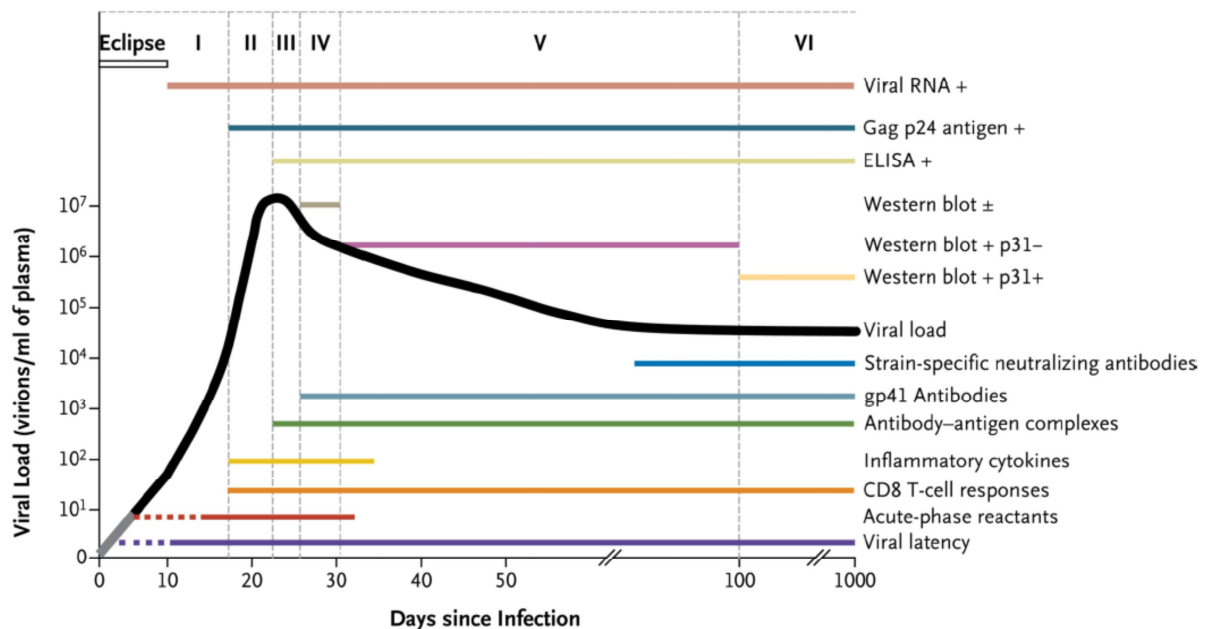


Figure 6. Stadification de la primo-infection selon Fiebig. Adaptée de Cohen et al. 2011.

La primo-infection est décomposée en six stades chronologiques : (i) ARN-VIH positif, (ii) Ag p24 positif, (iii) sérologie positive, (iv) western blot indéterminé, (v) western blot positif avec p31 négative et (vi) western blot positif avec p31 positive.

Du point de vue clinique, la primo-infection est fréquemment symptomatique (65-95%) et se présente fréquemment sous l'allure d'un syndrome pseudo-grippal (Tableau 1) [Henn *et al.* 2017].

**TABLEAU 1. SIGNES CLINICO-BIOLOGIQUES OBSERVABLES LORS D'UNE PRIMO-INFECTION VIH.**

| Symptôme ou signe biologique                  | Fréquence (%) |
|---|---------------|
| Fièvre  | >90           |
| Eruption maculo-papuleuse                     | 55-73         |
| Polyadénopathie                               | 57            |
| Pharyngite                                    | 40-77         |
| Amaigrissement                                | 19-50         |
| Ulcérations buccales et/ou génitales          | 30-40         |
| Myalgies, arthralgies                         | 30-60         |
| Troubles digestifs : diarrhée, nausées        | 33            |
| Céphalées                                     | 29-55         |
| Autres signes neurologiques                   | 13            |
| Thrombopénie (<150 000 plaquettes)            | 30-74         |
| Neutropénie, anémie                           | 35-26         |
| Lymphopénie (<1000 cellules/mm <sup>3</sup> ) | 30            |
| Cytolyse hépatique                            | 23-46         |

Les symptômes se résolvent en quelques semaines chez la plupart des personnes.

## ***D. Diversité virale et réservoirs en primo-infection***

### **1. Généralités sur le réservoir**

Le **réservoir VIH** peut être défini comme l'ensemble des cellules cibles du VIH ayant intégré le virus dans leur génome. Ces cellules cibles sont nombreuses, outre les lymphocytes T CD4+, on peut noter les monocytes-macrophages, les cellules folliculaires dendritiques et les cellules de la microglie cérébrale. La diversité des types cellulaires et leur localisation anatomique variée allant du tractus génital au système nerveux central créent autant de sanctuaires pouvant abriter le VIH (Figure 7). Certaines de ces cellules ont une demi-vie très longue ce qui prédit la persistance virale [Strain *et al.* 2003].

Ces différents compartiments peuvent être considérés comme des réservoirs différents du VIH dans lesquels le virus se comporte de façon différente en raison de :

- la composition cellulaire du compartiment ;
- l'existence éventuelle d'une barrière anatomique autour du compartiment et donc des échanges possibles avec les autres compartiments réservoirs ;
- la pression de sélection immunitaire dans le compartiment ;
- la pression de sélection médicamenteuse dans le compartiment (notamment en raison de la pénétration locale des molécules antirétrovirales).

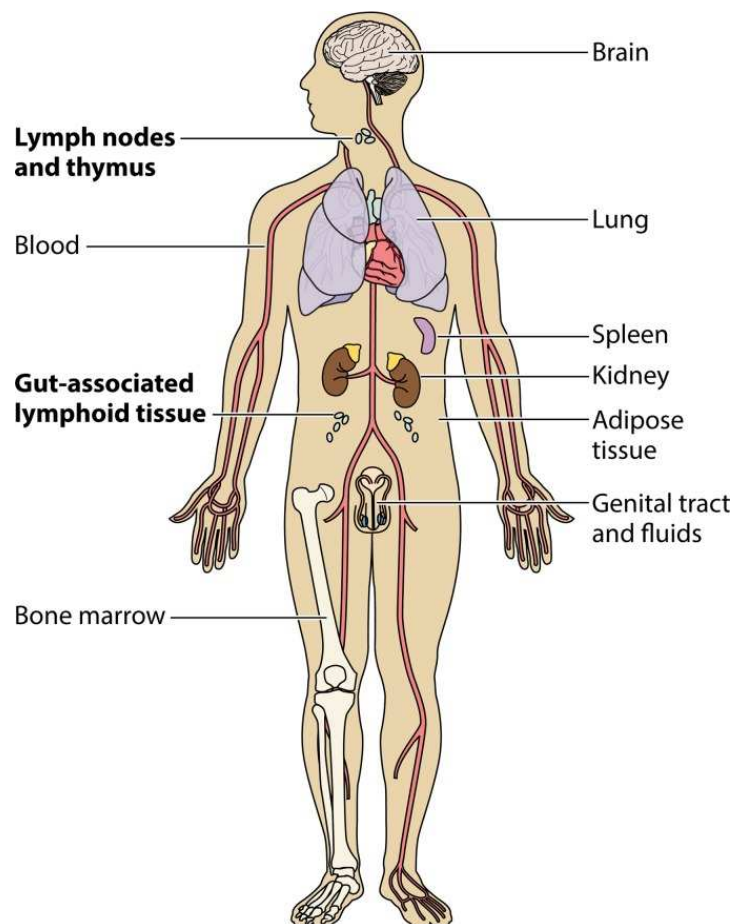


Figure 7. Distribution anatomique des réservoirs VIH. Adaptée de Avettand-Fenoel et al. 2016.

Les compartiments anatomiques identifiés comme réservoirs du VIH sont, par ordre quantitatif décroissant : le tissu lymphoïde associé au tractus digestif, les ganglions lymphatiques et les autres compartiments (sang, cerveau, poumon, rate, rein, tissu adipeux, moelle osseuse et tractus génital) [Estes et al. 2017].

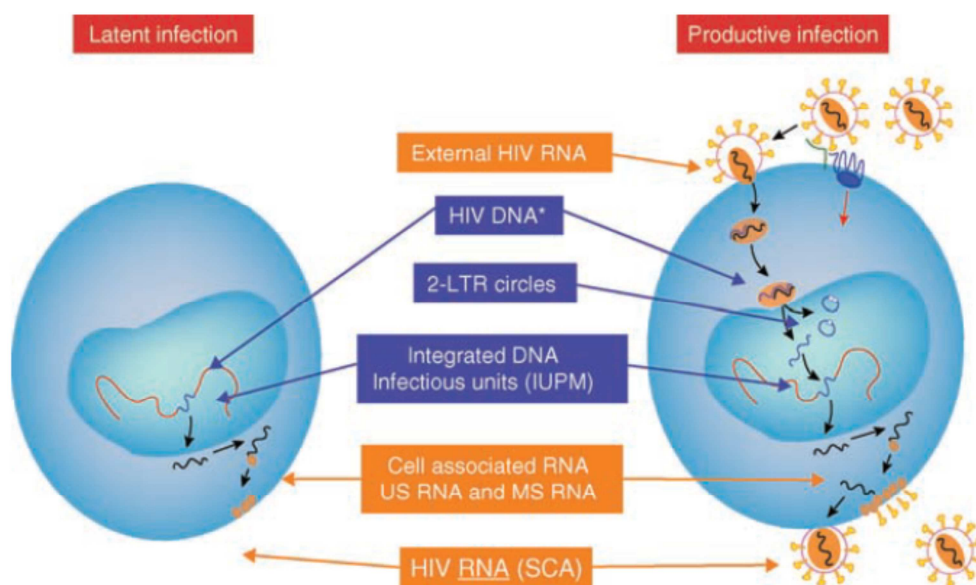
### Techniques de mesure du réservoir

Différentes techniques de détection et de quantification des réservoirs VIH sont retrouvées dans la littérature. Ces techniques font appel soit à de la culture virale après induction, soit à de la biologie moléculaire.

La première approche, plus fonctionnelle, consiste en la mise en culture de cellules cibles du VIH puis la stimulation de celles-ci et enfin la détection de la production de particules virales. Cette technique, nommée qVOA pour *quantitative viral outgrowth assay* a été l'une des premières techniques utilisées historiquement [Chun et al. 1998]. Différents types de cellules peuvent ainsi être étudiées, provenant de différents compartiments réservoirs, sanguins ou autres.

La seconde approche consiste en la mise en évidence de génome du VIH sous sa forme ADN par des techniques de biologie moléculaire. L'ADN VIH peut être présent sous différentes formes dans la cellule (Figure 8) :

- les formes intégrées (provirus) ;
- les formes non-intégrées : cercles 2-LTR, cercles 1-LTR, ADN linéaire non intégré.



*Figure 8. Approches de quantification du réservoir VIH par biologie moléculaire. Adaptée de Lewin et al. 2011.*

Différentes techniques sont utilisées pour détecter ces différentes formes d'ADN VIH.

La mesure de l'ADN VIH intégré est une PCR utilisant deux amorces :

- la première s'hybride dans la partie terminale du génome du VIH, le LTR ;
- la seconde s'hybride à une séquence répétée dans le génome humain, par exemple les séquences Alu, car l'intégration du génome de virus est possible à différents endroits du génome humain.

L'ADN 2-LTR peut également être quantifié par PCR avec des amorces s'hybridant dans les deux séquences LTR juxtaposées.

Enfin, l'ADN VIH total peut également être quantifié, il est le reflet de toutes les formes d'ADN VIH potentiellement présentes dans les cellules hôtes.

Cependant, grâce au séquençage du génome entier du virus Lee *et al.*, ont démontré qu'une majorité des formes d'ADN VIH présentes dans les cellules sont en réalité des formes défectives du virus, principalement en raison de large délétions internes [Lee *et al.* 2017]. Ainsi, la quantification des différentes formes d'ADN VIH ne reflète pas le réservoir fonctionnel du virus.

Plusieurs équipes ont comparé les résultats de quantification du réservoir VIH avec ces différentes techniques. Il en ressort que les techniques de biologie moléculaire sur-quantifient le niveau de réservoir, et que le qVOA, quant à lui, sous-quantifie le niveau de réservoir [Ho *et al.* 2013]. Néanmoins, les résultats obtenus dans ces différentes techniques sont plus ou moins corrélées : elles peuvent être utilisées indépendamment ou conjointement dans des études en prenant en compte les limites de chacune [Eriksson *et al.* 2013].

On peut noter que pour des études impliquant l'analyse d'un grand nombre de prélèvements, la mesure de l'ADN VIH total semble la plus intéressante par rapport aux autres techniques. D'une part les techniques de qVOA et de la mesure de l'ADN VIH intégré sont longues et coûteuses à mettre en œuvre et manquent de reproductibilité. D'autre part, la quantification de l'ADN VIH total est rapide et peu coûteuse et semble davantage reproductible [Avettand-Fenoel *et al.* 2016 ; Gantner *et al.* 2017]. Certes, cette dernière technique sur-quantifie le niveau de réservoir car quantifie également les virus défectifs et non-infectieux mais les



formes non-intégrées et défectives peuvent parfois tout de même être traduites en protéines et ainsi participer à l'inflammation [Avettand-Fenoel *et al.* 2016 ; Imamichi *et al.* 2016].

De nombreuses cohortes ont été mises en place pour étudier la dynamique virale et les réservoirs en primo-infection. La plupart de ces études sont focalisées sur l'analyse du compartiment sanguin. A l'échelle internationale, la cohorte thaïlandaise incluant des personnes dépistées et en primo-infection, et à l'échelle nationale, la cohorte PRIMO incluant les personnes dépistées et traitées en primo-infection seront les deux principales cohortes abordées en terme de résultats (Tableau 2).

**TABLEAU 2. DESCRIPTIF DES DEUX PRINCIPALES ETUDES DU RESERVOIR VIH EN PRIMO-INFECTIION ANALYSEES.**

| <b>Cohorte</b>                  | <b>RV254/SEARCH010 et<br/>RV304/SEARCH013</b>   | <b>ANRS C06 PRIMO cohort</b>  |
|---------------------------------|---|---|
| <b>Investigateur principal</b>  | Ananworanich J.   | Meyer L.  |
| <b>Lieu de recrutement</b>      | Thaïlande   | France  |
| <b>Critères d'inclusion</b>     | Inclusion des personnes<br>dépistées aux stades de Fiebig<br>I à IV                     | Inclusion des personnes<br>dépistées aux stades de Fiebig<br>I à V                    |
| <b>Principales publications</b> | Robb <i>et al.</i> 2016<br>Ananworanich <i>et al.</i> 2016<br>Sereti <i>et al.</i> 2017 | Goujard <i>et al.</i> 2006<br>Chéret <i>et al.</i> 2015<br>Laanani <i>et al.</i> 2015 |

## **2. Compartiment sanguin**

### **1. Diversité et dynamique virale de l'ARN VIH sanguin**

La connaissance de la génétique virale et de la complexité des variants transmis lors de la contamination sexuelle est primordiale pour la mise au point de stratégies préventives et curatives. La plupart des études de cohortes de personnes en primo-infection ont montré que le nombre de souches transmises et la diversité génétique étaient limités [Keele *et al.* 2008, Parrish *et al.* 2013]. Le nombre de variants différents transmis pourrait être plus important

chez les HSH, ceci probablement en raison d'une meilleure perméabilité de la muqueuse anale [Li *et al.* 2010]. Mais ceci reste controversé : en effet Tully *et al.* ont récemment montré que le mode de transmission n'impacte pas le nombre de variants transmis mais leurs signatures génétiques [Tully *et al.* 2016]. Une pression de sélection plus importante a été notée pour les modes de transmission à faible risque (hétérosexuel par rapport à HSH) et pour le type de rapport (anal insertif par rapport à anal réceptif). Lors d'une transmission hétérosexuelle, des polymorphismes simples ont été observés dans la gp41, alors que lors d'une transmission HSH, de multiples mutations sont associées dans la gp120 (notamment dans les résidus impliqués dans la liaison aux acides aminés). Les souches sélectionnées ont probablement une meilleure capacité répliquative et conduisent donc à un meilleur rendement d'infection [Carlson *et al.* 2014]. Il est donc admis que la diversité virale sanguine observée en primo-infection est faible, la quasispèce virale se diversifiant avec le temps, lors de l'échappement à la réponse immunitaire. Cependant, en utilisant des techniques de séquençage à haut débit, Kijak *et al.* ont montré la présence de variants minoritaires dès la primo-infection. Dans cette étude, ces variants minoritaires présents chez cinq individus ont pu devenir majoritaires après la mise en place d'une réponse immunitaire contre la souche initialement majoritaire (Figure 9).

Le contrôle de la virémie d'équilibre est associé à la réponse CD8 spécifique [Ndhlovu *et al.* 2015]. En effet, dans une petite cohorte sud-africaine de primo-infection, la rapidité de la réponse CD8 et l'intensité de leur activation étaient inversement corrélées au niveau d'équilibre de la virémie.

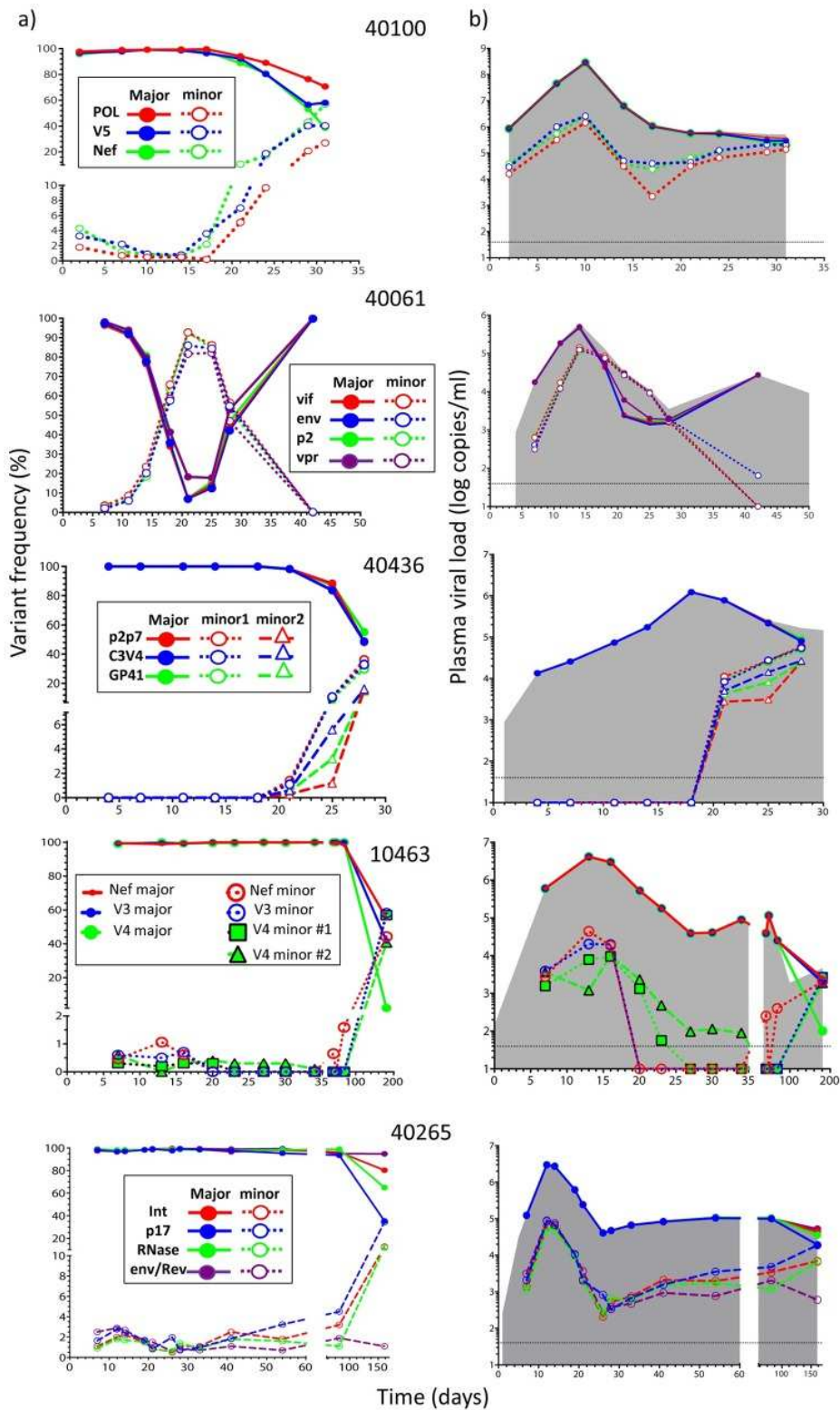


Figure 9. Exemple de la dynamique de variants minoritaires sanguins en primo-infection. Adaptée de Kijak et al. 2016.

Le panel de gauche représente la variation des variants observés en pourcentage de la quasiespèce. Le panel de droite représente la charge virale de chacun des variants de la quasiespèce.

## 2. Diversité et dynamique virale de l'ADN VIH sanguin

Un réservoir de cellules latentes infectées par le virus est établi depuis la primo-infection [Chun *et al.* 1998]. La capacité répliquative des variants transmis pourrait impacter l'activation immunitaire et la quantité d'ADN-VIH dans les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> en primo-infection [Claiborne *et al.* 2015]. En effet, Claiborne *et al.* ont amplifié les séquences de *gag* à 3 mois post-infection de 127 individus dans un ADN proviral connu (MJ4). La capacité répliquative de ce virus chimérique a ensuite été mesurée en culture cellulaire, et stratifiée en faible et forte selon la position par rapport à la valeur médiane. Dans une sous-étude, chez 21 individus, les sous-populations de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> ont été triées par cytométrie en flux en : naïf (TN), central mémoire (TCM) et effecteur mémoire (TEM). Dans ces trois sous-populations les valeurs d'ADN-VIH total étaient plus élevées pour les personnes porteuses de variants à capacité répliquative élevée [Claiborne *et al.* 2015].

Cependant la diversité génétique dans les provirus sanguins est faible en primo-infection [Novitsky *et al.* 2009]. En effet, en séquençant la *gp120* de l'ADN VIH sanguin obtenu par dilution limite de huit individus, il a été montré que la diversité virale est faible en tout début d'infection et augmente avec le temps. La persistance d'une faible diversité virale a d'ailleurs été associée à un rapide déclin du nombre de lymphocytes T CD4<sup>+</sup>.

Par ailleurs, Lee *et al.* ont récemment démontré que la plupart des provirus sont intacts en primo-infection [Lee *et al.* 2018]. Après séquençage du génome entier de CMSP infectées par le VIH de quatre individus en primo-infection (au stade II de Fiebig, n=2 et au stade V de Fiebig, n=2), on note que :

- le nombre de génomes intacts par million de CMSP augmente au cours du temps, passant de 22 à 31 entre les deux stades ;
- la fréquence de génomes intacts dans la quasiespèce archivée dans l'ADN-VIH diminue avec le temps, passant de 91% à 22%.

Ceci laisse penser à une accumulation rapide des clones défectifs à mesure que le réservoir se remplit en primo-infection.

Ensuite, Chéret *et al.* ont démontré qu'en primo-infection toutes les sous-populations lymphocytaires sanguines ne contribuent pas de manière équivalente au réservoir VIH sanguin [Chéret *et al.* 2015]. Dans cette étude l'ADN-VIH total a été quantifié dans les sous

populations lymphocytaires suivantes : naïf (TN), central mémoire (TCM), transitionnel mémoire (TTM) et effecteur mémoire (TEM). Le pourcentage le plus élevé de contribution au réservoir sanguin a été retrouvé dans les TTM.

Enfin, sur la quantification du réservoir VIH sanguin, aucune étude utilisant le qVOA chez des personnes en primo-infection en pré-thérapeutique n'est à ce jour publiée. En revanche, plusieurs études ont quantifié l'ADN-VIH total (Figure 10) [Avettand-Fenoel *et al.* 2016]. Dans la cohorte PRIMO et pour 552 individus, l'ADN-VIH médian à la découverte de la primo-infection était de 3,3 log copies/million de CMSP [Goujard *et al.* 2006]. Dans l'essai OPTIPRIM, l'ADN-VIH total médian au début de l'étude était de 3,6 log copies/million de CMSP [Chéret *et al.* 2015]. Dans la cohorte Thaï, le pic de charge virale ADN-VIH se situe aux alentours de 3 log copies/million de CMSP [Ananworanich *et al.* 2016]

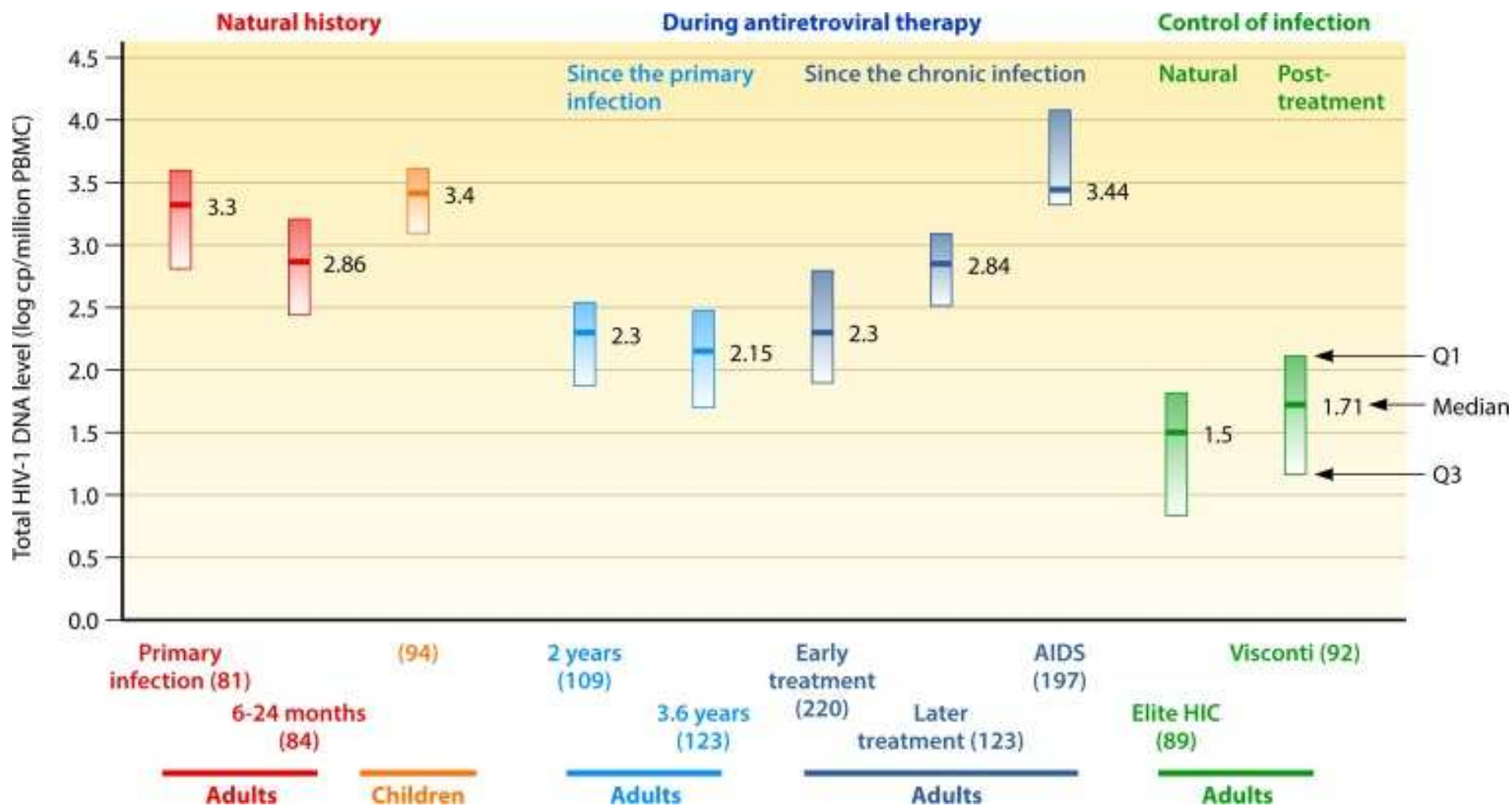


Figure 10. Niveau d'ADN-VIH en fonction du stade clinique et thérapeutique lors de l'infection à VIH. Adaptée de Avettand-Fenoel et al. 2016.

L'ADN VIH dans ces différentes études a été quantifié par PCR ADN-VIH mise au point par le groupe quantification de l'AC11 de l'ANRS [Avettand-Fenoel et al. 2009].

### 3. Le tractus génital masculin

Le tractus génital masculin se compose des testicules avec l'épididyme, le *vas deferens*, les vésicules séminales, la prostate et le pénis. Il est généralement admis que le tractus génital masculin est un sanctuaire viral principalement en raison de l'existence de la barrière hémato-testiculaire [Borzy *et al.* 1988]. Cette barrière est formée par l'existence de jonctions serrées entre les cellules de Sertoli des tubules séminifères, créant un microenvironnement derrière celles-ci [Cheng *et al.* 2012]. Il est important de définir si le tractus génital masculin peut bel et bien être considéré comme un site sanctuaire. Cette notion a été majoritairement étudiée sur des prélèvements spermatiques. La détection du VIH dans le sperme est possible chez les hommes à des niveaux variables en fonction du stade de l'infection, la prise d'un traitement antirétroviral et de la présence concomitante d'autres infections sexuellement transmissibles [Kalichman *et al.* 2008 ; Mujugira *et al.* 2016].

Bien que le sperme soit composé de sécrétions et de cellules des testicules, de l'épididyme, de la prostate, des vésicules séminales et des glandes bulbo-urétrales, peu d'études ont analysé la réplication du VIH dans ces différents sites. La vasectomie n'a que peu de d'effet sur la détection de l'ARN-VIH dans le sperme, ce qui suggère que les testicules et l'épididyme ne sont pas des sources principales de particules virales dans le sperme [Krieger *et al.* 1998]. Deleage *et al.* ont analysé des explants de vésicules séminales de personnes virémiques naïves de traitement et de personnes traitées avirémiques, et ont montré que des protéines virales et de l'ARN-VIH peuvent être détectés. Au niveau de ce site, les principales cellules infectées étaient les macrophages mais également les lymphocytes T [Deleage *et al.* 2011]. Le Tortorec *et al.* ont utilisé des explants prostatiques d'hommes nécessitant une prostatectomie pour une hypertrophie bénigne de la prostate afin de tester la susceptibilité à l'infection par le VIH des cellules résidentes. L'infection efficace et la réplication dans les lymphocytes T et les macrophages locaux a été observée [Le Tortorec *et al.* 2008]. Ganor *et al.* ont obtenu des prélèvements de pénis entiers de personnes transgenres lors de l'opération chirurgicale de changement de sexe et ont identifié les macrophages comme étant les cellules initialement infectées par le VIH [Ganor *et al.* 2013]. Sur le même type de prélèvements, mais cette fois-ci des personnes vivant avec le VIH sous traitement antirétroviral efficace, ils ont démontré que les macrophages urétraux polarisés M1/M2 (transitionnels) contenaient des protéines du VIH, de l'ADN-VIH intégré et produisaient des particules virales [Bomsel *et al.* 2017]. Ainsi,

les macrophages semblent être les cellules réservoirs majeures dans la muqueuse génitale et être la source de réplication locale.

En résumé, le VIH peut être détecté dans différents sites du tractus génital masculin, avec les macrophages comme source locale d'infection.

Durant la primo-infection, les souches virales présentes dans le sperme d'individus nouvellement infectés sont en général identiques aux souches sanguines, ce qui suggère un import récent et direct du compartiment sanguin [Ritola *et al.* 2004]. Ces souches séminales proviennent donc probablement d'une diffusion passive de virions sanguins ou du passage de cellules sanguines infectées (Figure 11). Au stade d'infection récente (après 3 mois d'infection), le niveau d'ADN-VIH total dans les cellules rondes du sperme est plus important qu'au moment de la primo-infection [Chéret *et al.* 2017]. Ces résultats suggèrent que la compartimentalisation du réservoir VIH dans le tractus génital masculin est plus tardive. Ceci peut s'expliquer par une infection par le VIH des CMSP sous un mode graduel en primo-infection, et un transfert secondaire de ces CMSP vers le tractus génital masculin lors de l'infection récente (Figure 11).

#### **4. Le tractus génital féminin**

Le tractus génital féminin est un milieu complexe, à la fois sur le plan immunologique et microbiologique, qui comprend deux compartiments anatomiques pour le tractus génital haut (trompes de Fallope et endomètre) et bas (endocol, exocol et vagin), créant différents environnements [Lee *et al.* 2015]. Cependant il n'y a pas de barrière physique entre le sang et le tractus génital féminin ; ainsi, à la fois les médicaments et les virus sont supposés pouvoir circuler librement entre les deux compartiments. La distribution des leucocytes principaux varie selon les différentes phases du cycle menstruel. Les cellules immunitaires les plus représentées sont les lymphocytes T, les macrophages et les cellules NK, les deux premières étant les principales cibles du virus. La plupart des études ayant abordé le tractus génital féminin se sont focalisées sur les sécrétions cervicovaginales, mais sont confrontées à des biais d'échantillonnage des muqueuses, lors duquel un écouvillonnage trop invasif peut impacter les résultats.

Concernant les différents sites du tractus génital féminin, l'endocol et l'exocol semblent être les régions les plus impliquées dans l'infection par le VIH. En effet, les cellules résidentes



sont fréquemment, mais à de faibles niveaux, porteuses d'ADN-VIH à la fois chez des personnes virémiques naïves de traitement et des personnes traitées avirémiques [Iversen *et al.* 2004 ; Nunnari *et al.* 2005]. Une seule étude a investigué l'implication de l'endomètre dans le réservoir VIH et a montré que les lymphocytes T CD4+ étaient rarement présents, voire absents, dans ce site, ce qui suggère qu'il n'est probablement pas une source importante pour la présence de particules virales dans les sécrétions cervicovaginales [Johnstone *et al.* 1994]. Il n'y a pas d'informations dans la littérature actuelle sur le rôle des trompes de Fallope dans l'infection à VIH.

Il existe peu de données sur le tractus génital féminin lors de la primo-infection VIH. Klein *et al.* ont comparé la diversité génétique des quasiespèces virales entre sécrétions cervicovaginales et sang au moment de la primo-infection chez 72 femmes africaines. Les quasiespèces génitales présentaient une diversité génétique plus élevée que les quasiespèces sanguines [Klein *et al.* 2018]. Ce résultat suggère que (i) une réplication locale compartimentalisée est possible dans le tractus génital féminin et ce, dès la primo-infection et que (ii) le clone viral possédant la meilleure capacité répliquative face à la pression de sélection du compartiment génital est transmis au sang (Figure 12).

## 5. Le tractus digestif

Le tissu lymphoïde associé au tube digestif ou GALT pour *Gut-associated lymphoïde tissue* est probablement le plus important réservoir du VIH de par [Thompson *et al.* 2017] :

- la présence d'un nombre important de cellules cibles du virus ;
- son rôle de porte d'entrée lors de la contamination.

Le GALT est le plus grand composant du tissu lymphoïde, il comprend les amygdales, les plaques de Peyer, les agrégats lymphoïdes de l'estomac et de l'intestin et les cellules lymphoïdes de la lamina propria. Le GALT est un des premiers tissus à être infectés après l'exposition au virus, et on note une déplétion des lymphocytes T CD4+ dès le quatrième jour d'infection [Guadalupe *et al.* 2003].

Crowell *et al.* ont montré que l'infiltration du GALT par le VIH est rapide dès la primo-infection [Crowell *et al.* 2016]. L'ADN et l'ARN-VIH ont été quantifiés sur des biopsies obtenues par rectosigmoïdoscopie chez 41 participants de l'étude RV254. Parmi eux, 76%

(n=31) avaient un ARN-VIH détectable dans la biopsie sigmoïdienne, ces personnes étaient infectées depuis plus longtemps que les autres (16 jours VS 11 jours). Les marqueurs d'activation immunitaires et l'ADN-VIH colonique étaient significativement plus élevés chez ces personnes, et une tendance à un ADN-VIH total plus élevé dans les CMSP a été observée. Une corrélation entre l'ADN-VIH sanguin et colonique avait déjà été observée [Avettand-Fenoel *et al.* 2008], et le niveau d'infection du tractus digestif a été identifié comme marqueur pronostique de l'inflammation [Tincati *et al.* 2009].

D'autre part, une déplétion importante en lymphocytes T CD4+ est notée dès la primo-infection avec une installation rapide qui augmente avec le temps de l'infection [Ananworanich *et al.* 2012]. Entre les stades de Fiebig I et III, la proportion de lymphocytes T CD4+CCR5+ (sur les lymphocytes T CD4+ totaux) chute de 53% à 19%. Cette baisse concerne une déplétion majeure des sous-populations TEM et TCM [Ananworanich *et al.* 2012]. Les variants viraux seraient identiques entre le sang et les cellules rectales au moment de la primo-infection [Bacchus *et al.* 2013].

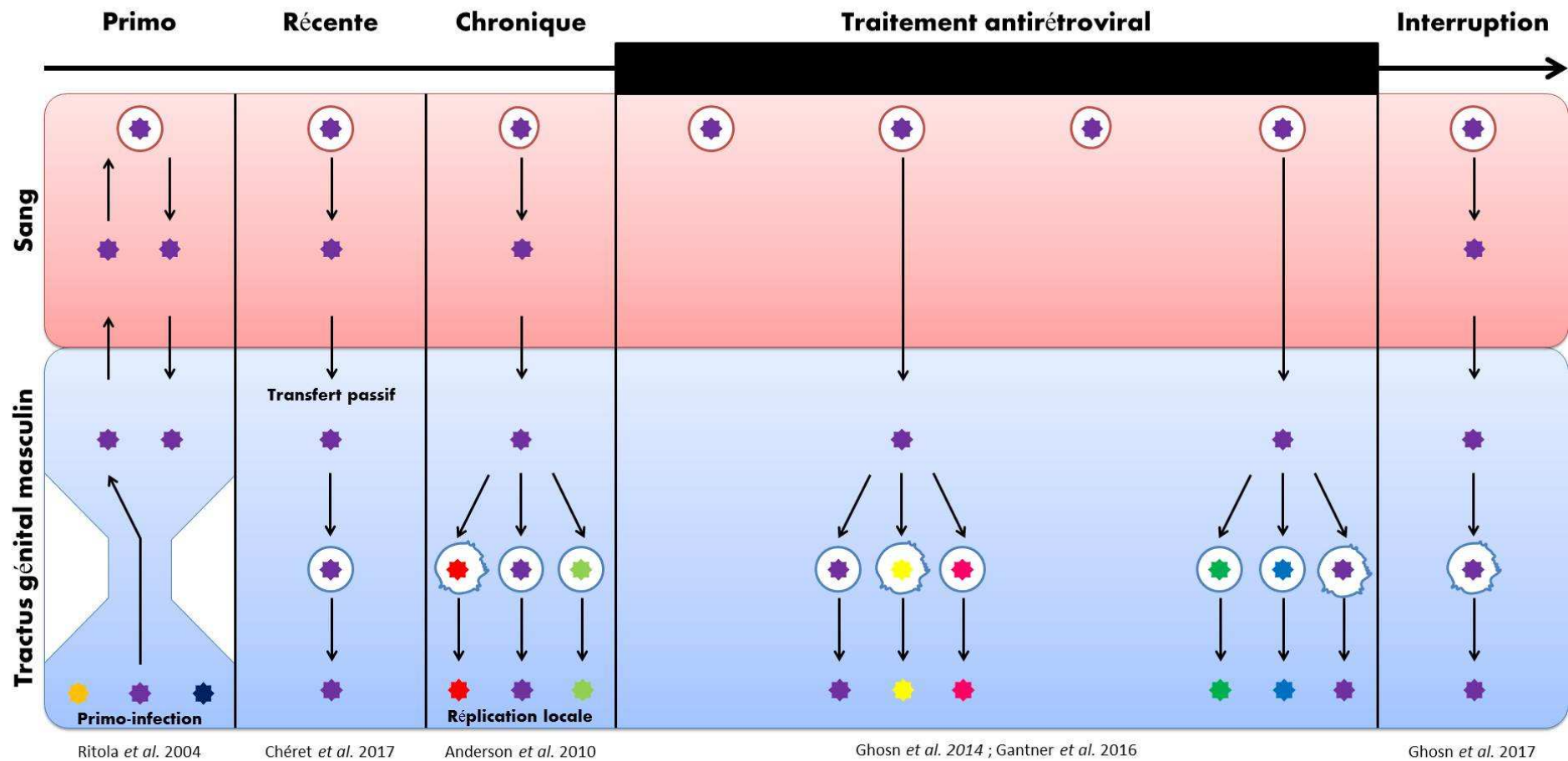


Figure 11. Modélisation de la compartimentalisation du VIH dans le tractus génital masculin à différents stades cliniques et thérapeutiques de l'infection. Adaptée de Gantner et al. 2018.

La compartimentalisation varie au cours du temps, elle semble intermittente et transitoire.

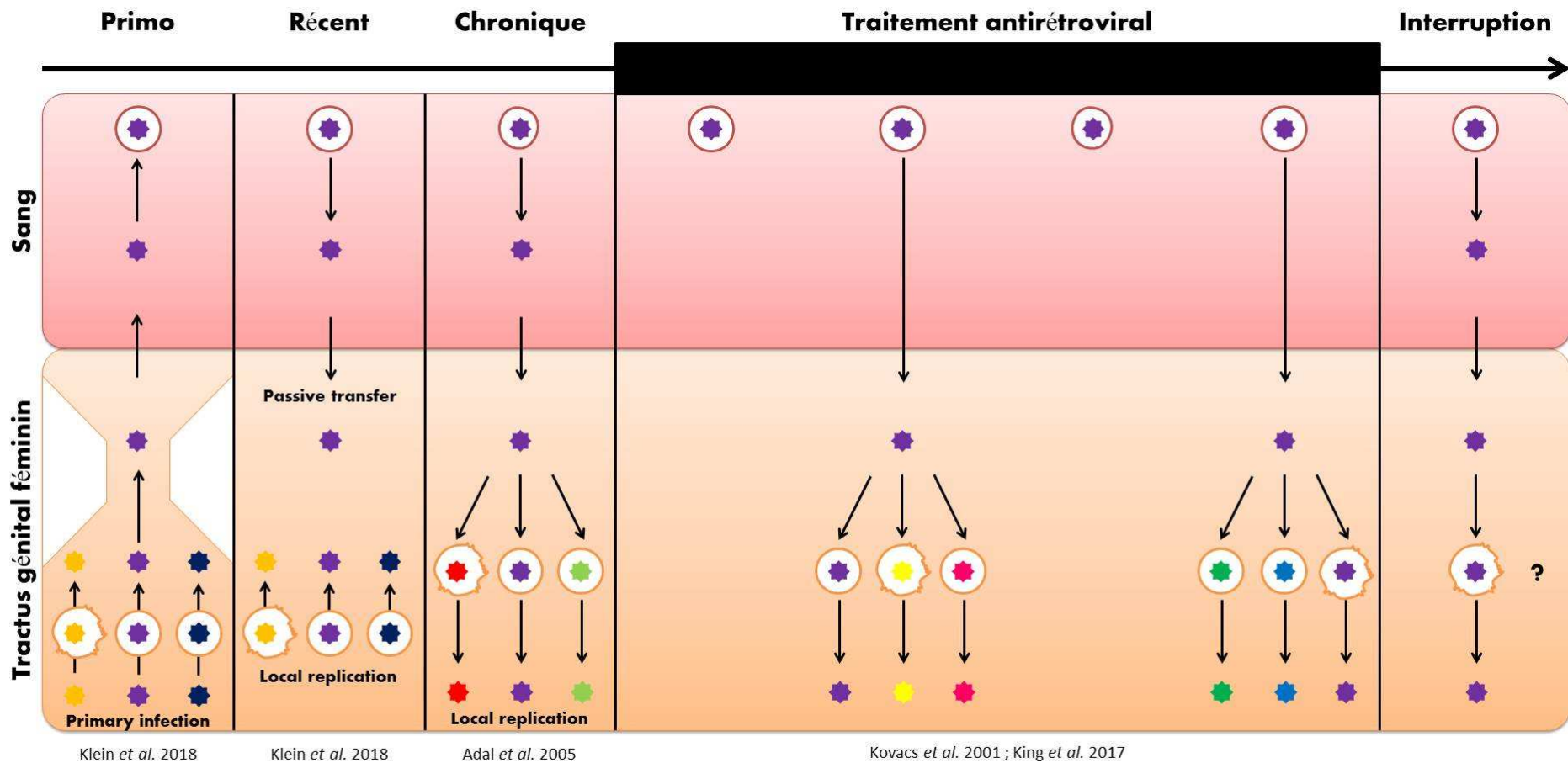


Figure 12. Modélisation de la compartimentalisation du VIH dans le tractus génital féminin à différents stades cliniques et thérapeutiques de l'infection. Adaptée de Gantner et al. 2018.

La compartimentalisation varie au cours du temps, elle semble intermittente et transitoire.

**En résumé**, au cours de la primo-infection :

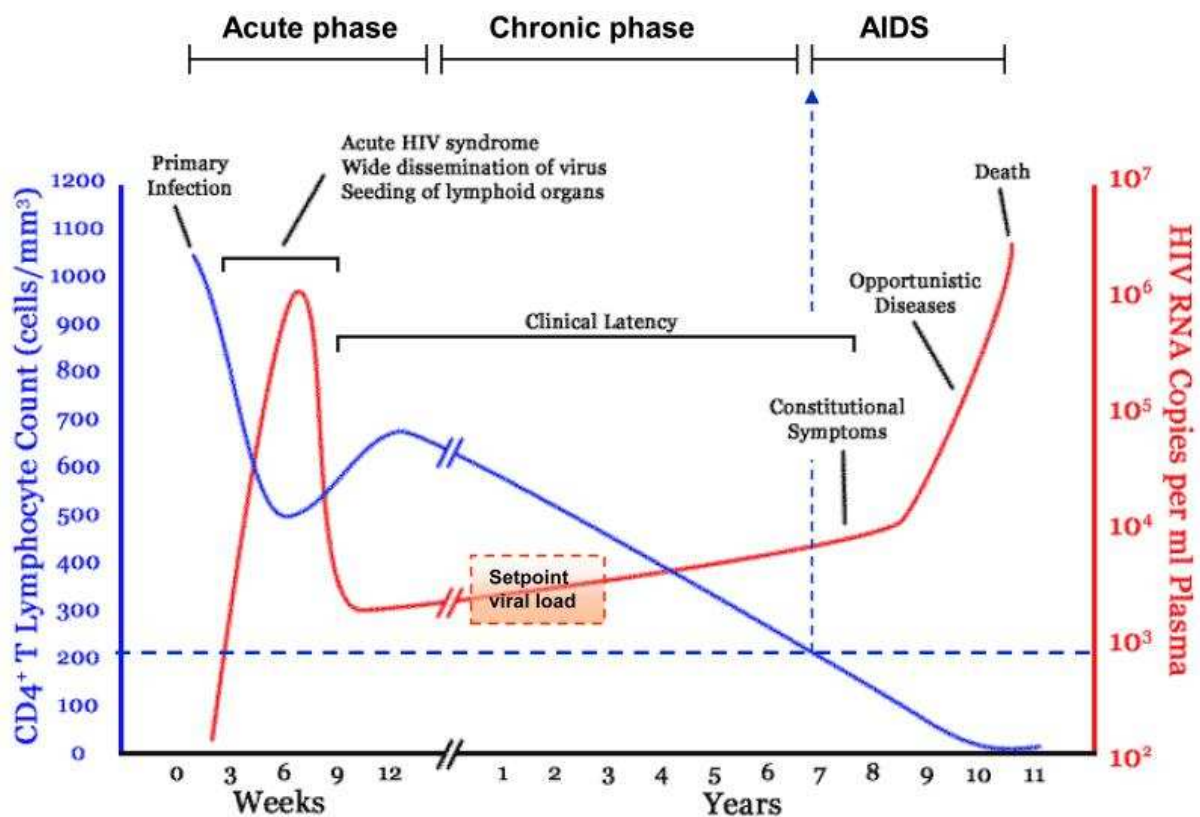
- L'ARN et l'ADN-VIH sont élevés dans le sang [Avettand-Fenoel *et al.* 2016]
- La diversité génétique des provirus sanguins est faible [Novitsky *et al.* 2009]
- La plupart des provirus sont intacts au tout début de l'infection [Lee *et al.* 2018]
- La contribution la plus importante au réservoir VIH sanguin est dans les TTM [Chéret *et al.* 2015]
- L'ARN et l'ADN-VIH sont élevés dans le sperme, les sécrétions cervicovaginales et le tissu rectal [Chéret *et al.* 2017 ; Klein *et al.* 2018 ; Crowell *et al.* 2016]
- Les séquences sont identiques entre le sang, le sperme et le tissu rectal [Chéret *et al.* 2017 ; Bacchus *et al.* 2013]
- La diversité génétique est plus importante dans les sécrétions cervicovaginales [Klein *et al.* 2018]

## II. Infection chronique

Après la primo-infection, soit au-delà de 6 mois après la contamination, l'infection à VIH est alors qualifiée de chronique. Cette phase à long terme correspond à une phase d'équilibre entre la réplication permanente du virus et la destruction de celui-ci par le système immunitaire. Durant cette période, le nombre de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> diminue progressivement avec le temps selon une pente variable. Cette phase est le plus souvent asymptomatique, et, au bout de plusieurs années, les personnes vivant avec le VIH développent des symptômes en association avec la baisse de l'immunité. Nous allons rapidement présenter la clinique de cette longue phase réplivative du virus dans l'organisme et ses conséquences pour ensuite décrire l'évolution du réservoir viral pendant cette phase.

### A. Clinico-biologie de la phase chronique

La plupart des personnes vivant avec le VIH sont asymptomatiques au stade de l'infection chronique pendant une durée médiane de sept années (Figure 13).



*Figure 13. Histoire naturelle de l'infection par le VIH en l'absence de traitement antirétroviral. Adaptée de An et al. 2010.*

*En infection chronique, la charge virale est équilibrée et le nombre de lymphocytes T CD4+ chute progressivement.*

A ce stade, la sérologie VIH et la charge virale ARN sont positives. Cette phase est donc caractérisée par :

(1) une réplication permanente du virus, qui stimule en permanence une nouvelle réponse immunitaire adaptative. Ce phénomène entraîne l'activation immunitaire ou l'inflammation. Cette inflammation permanente induit une morbi-mortalité propre liée notamment à des maladies cardiovasculaires [El-Sadr *et al.* 2006 ; Paiardini *et al.* 2013]. On peut entre autres noter une augmentation de l'épaisseur intima-média au cours du temps chez les personnes vivant avec le VIH [Baker *et al.* 2011]. L'inflammation peut donc endommager lentement les vaisseaux sanguins et accroître ainsi le risque de maladies cardiovasculaires (crise cardiaque et accident vasculaire cérébral). De plus, elle risque d'accélérer la progression des lésions du foie chez les personnes atteintes d'une hépatite virale et d'endommager les os, les reins et d'autres parties du corps.

(2) une baisse progressive du nombre de lymphocytes T CD4+, qui favorise avec le temps l'apparition de maladies opportunistes (cancers et infections). Sans traitement, la plupart des personnes vivant avec le VIH deviennent symptomatiques. La nature des symptômes et le temps qu'ils mettent à se manifester varient largement d'une personne à une autre. Les symptômes les plus couramment signalés comprennent : une fatigue chronique, une perte de poids inexplicable, une diarrhée, de la fièvre, des sueurs nocturnes et des manifestations cutanées. Un nombre de lymphocytes T CD4+ en dessous de  $200/\text{mm}^3$  entraîne l'apparition de maladies opportunistes. Certaines infections susceptibles d'entraîner de graves complications, voire la mort, comprennent par exemple la pneumocystose (pneumonie à *Pneumocystis*) ou la toxoplasmose (*Toxoplasmosis gondii*). Certains types de cancer, tels que le lymphome, sont également plus courants chez les personnes vivant avec le VIH.

Les risques de maladies opportunistes sont étroitement liés au nombre de lymphocytes T CD4+. Ces risques augmentent quand le nombre de lymphocytes T CD4+ passe sous le seuil des 200 cellules. Ainsi, toute personne ayant un nombre inférieur doit faire l'objet d'une recherche, d'une surveillance et bénéficier de stratégies de prévention de ces maaldies opportunistes.

Quelques cas particuliers sont à noter :

- (i) certains individus dits « non progresseurs à long terme » maintiennent un nombre de lymphocytes T CD4+ normal et ne présentent aucun symptôme pendant très longtemps.
- (ii) certains individus dits « contrôleurs » maintiennent une charge virale spontanément indétectable ou très faible pendant au moins 5 ans, également sans symptômes [Walker et al 2013].
- (iii) certains individus dits « progresseurs rapides » où l'infection au VIH progresse plus rapidement, causant des symptômes et une baisse importante du nombre de lymphocytes T CD4+ après quelques années seulement.

## ***B. Diversité virale et réservoirs en infection chronique***

### **1. Le compartiment sanguin**

Comme nous avons pu le voir, la charge virale est à un état d'équilibre lors de l'infection chronique. En revanche la quasi-espèce virale change au cours du temps [Lee et al ; 2008 ; Shankarappa *et al.* 1999], que ce soit au niveau des séquences obtenues dans l'ARN ou dans l'ADN-VIH sanguin. Shankarappa *et al.* ont séquencé le gène *env* dans l'ARN et l'ADN-VIH de neuf personnes vivant avec le VIH de façon longitudinale, de la primo-infection à en moyenne 10 ans d'infection chronique. Les séquences s'éloignent génétiquement du clone de primo-infection graduellement avec le temps (Figure 14) [Shankarappa *et al.* 1999]. Cependant, les clones isolés dans l'ADN-VIH sont la plupart du temps défectifs [Bruner *et al.* 2016], Ces clones semblent s'accumuler rapidement dès la primo-infection [Lee *et al.* 2018]. Ainsi chez deux individus virémiques en phase chronique de l'infection, seulement 35% des provirus séquencés étaient intacts. On peut noter que 57% des provirus possédaient des délétions et 8% étaient hypermutés [Bruner *et al.* 2016]. Par ailleurs, en terme de contribution des sous-populations lymphocytaires au réservoir VIH sanguin, il semble que chez les individus virémiques en infection chronique, les TCM aient un niveau d'infection supérieur à celui des TEM [Brenchley *et al.* 2004].



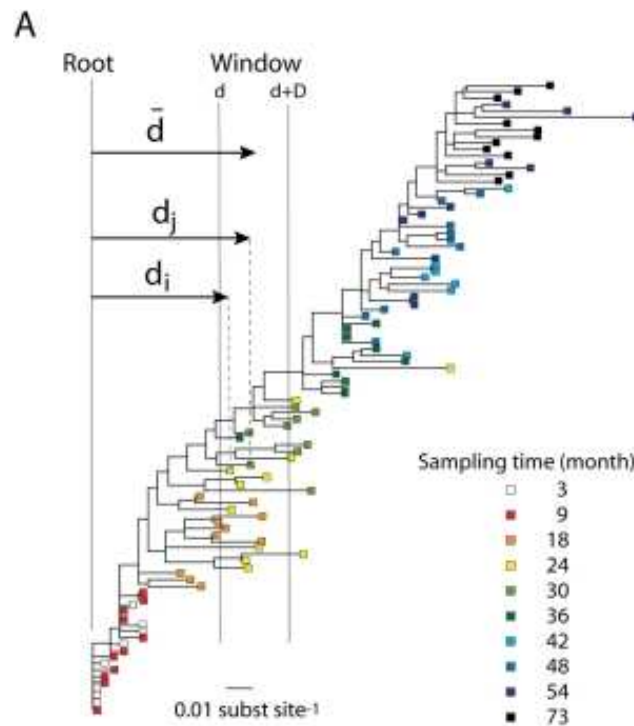


Figure 14. Évolution de la quasiespèce virale en l'absence de traitement antirétroviral. Adaptée de Lee et al. 2008.

La quasiespèce se diversifie au cours du temps, à la fois dans l'ARN et l'ADN-VIH.

L'évolution dynamique de la quasiespèce virale a été modélisée lors de l'infection chronique [Shriner et al. 2006 ; Frost et al. 2001]. Cette dynamique tient compte :

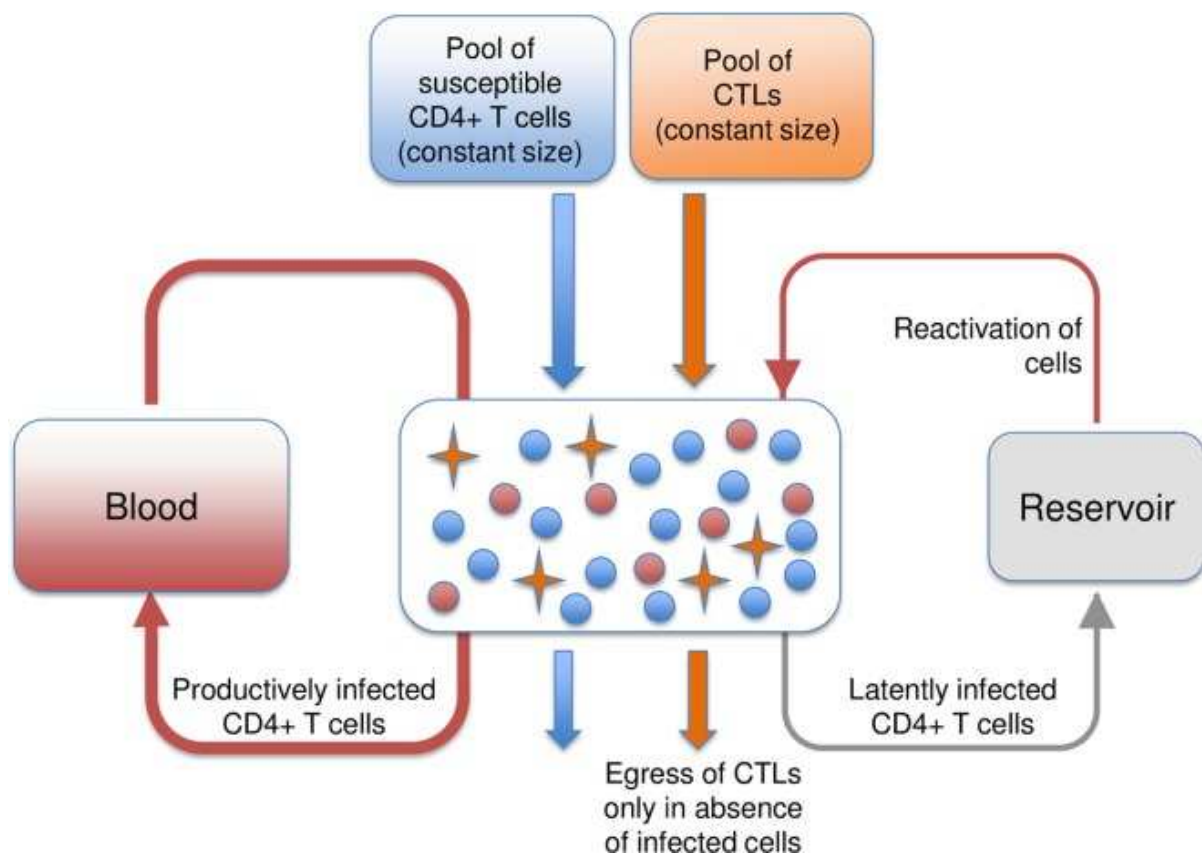
- du taux de mutation élevé de ce virus ;
- de la présence du virus dans plusieurs compartiments.

Le modèle convenant le mieux à la dynamique d'évolution génétique des variants VIH est celui de la métapopulation. Ce modèle reprend le corps humain infecté par le VIH et intègre une évolution de plusieurs sous-populations sujettes à migration, extinction et recolonisation. Les sous-populations sont différenciées spatialement, temporellement et sont interconnectées (par exemple au travers de la circulation sanguine). Chaque sous-population possède donc un patch d'habitat, ce qui correspond à la notion de compartiment.

Lythgoe et al. ont proposé un modèle de métapopulation avec évolution des patches dans le cadre de l'infection à VIH (Figure 15). Dans ce modèle, les lymphocytes T CD4+ non-infectés, infectés et les lymphocytes T cytotoxiques (CTL) traversent continuellement les patches de la métapopulation. À la phase d'infection chronique, on estime que le nombre de CTL spécifiques du VIH entrant dans chaque patch est constant. De ce fait, la production de

lymphocytes T CD4+ et de CTL est constante également et compense les pertes. En revanche le nombre de lymphocytes T CD4+ infectés entrant dans un patch est dépendant du nombre de cellules infectées dans le sang et du nombre de cellules infectées latentes dans le réservoir (si elles existent). Immédiatement après avoir été infectées, une petite proportion de cellules entrent en latence, faisant ainsi partie du réservoir, et peuvent circuler à nouveau après réactivation. Comme il existe peu de données sur la circulation des lymphocytes T CD4+ latents, l'hypothèse a été faite que leur entrée dans le patch se fasse directement à partir du réservoir. Les cellules infectées et non-infectées sortent du patch avec la même probabilité, comme pour les CTL en l'absence de cellules infectées dans le patch. Cependant, si des cellules infectées sont présentes, les CTL spécifiques du VIH (mais pas les autres CTL) sont retenues dans le patch, ce qui résulte de leur constante accumulation due à un apport sanguin. Avec l'accumulation des CTL, la réponse cytotoxique augmente également, et si cette réponse est suffisante, les cellules infectées sont potentiellement éliminées du patch. Dans ce cas les CTL retournent en circulation.

La modélisation de l'infection à VIH chronique en métapopulation explique donc à la fois les variations spatiales (compartmentalisation) et temporelle (glissements génétiques au cours du temps).



*Figure 15. Circulation des lymphocytes au travers d'un patch (compartiment). Adaptée de Lythgoe et al. 2016.*

*Les cercles rouges et bleus représentent respectivement les lymphocytes T CD4+ infectés et non-infectés, les croix orange représentent les CTL spécifiques du VIH. Tous ces éléments sont figurés au sein du patch, un compartiment (comme le tractus digestif ou les ganglions lymphatiques) comprenant un ou plusieurs patches ainsi qu'un réservoir.*

Après un pic d'ADN-VIH élevé, en primo-infection, celui-ci baisse légèrement aux alentours de 2.8 log copies/million de CMSP [Avettand-Fenoel *et al.* 2016]. Après plusieurs années de réplication, les niveaux d'ADN-VIH sont à nouveau plus élevés au stade SIDA, à 3,4 log copies/million de CMSP [Avettand-Fenoel *et al.* 2016]. Il semble que les niveaux d'ADN-VIH soient plus élevés en primo-infection qu'en infection chronique mais certaines équipes ont également montré qu'il n'y a pas de réelle différence [Koelsch *et al.* 2008]. Pinzone *et al.* ont mené une des rares études longitudinales avant traitement antirétroviral chez des personnes en primo-infection et en infection chronique. Chez six individus progressateurs non traités, une élévation de l'ADN-VIH intégré de 109 à 1941 copies/million de CMSP en médiane en environ 6 ans a été notée, avec une augmentation médiane de 300% par année [Pinzone *et al.* 2016]. Cette augmentation de la valeur de l'ADN-VIH intégré est corrélée à la baisse du rapport CD4/CD8. L'augmentation de l'ADN-VIH intégré après la primo-infection en l'absence de traitement a été modélisée [Murray *et al.* 2012]. Cette augmentation suit une régression non-linéaire, et semble atteindre 50% de son maximum au bout de deux ans d'infection.

## **2. Le tractus génital masculin**

Lors de l'infection chronique, une divergence génétique entre les quasiespèces virales du sperme et du sang est observée chez quelques individus. Cette diversification peut être expliquée par la réplication active dans les deux compartiments (correspondant à différents patches de la métapopulation) [Chaillon *et al.* 2017]. Anderson *et al.* ont proposé deux mécanismes distincts pour expliquer les similitudes et les divergences observées dans leur étude en séquençage comparatif sang/sperme (Figure 11) [Anderson *et al.* 2010] :

- transfert passif d'un compartiment à un autre dans la grande majorité des cas ;

- réplication virale autonome à partir d'un réservoir VIH spermatique chez quelques individus, s'accompagnant également d'une expansion clonale des cellules rondes du sperme infectées.

Différents prédictors de la présence et de la quantité de VIH dans le sperme chez des patients non traités sont [Tachet *et al.* 1999 ; Morris *et al.* 2017] :

- le niveau d'ARN-VIH plasmatique ;
- la détection concomitante d'herpesvirus dans le sperme, en particulier EBV, CMV et HSV.

Dans le cas particulier des individus contrôleurs, une étude de cohorte a récemment montré que la détection du virus dans le sperme est très fortement corrélée à la charge virale sanguine [Chaix *et al.* 2017]. Ceci suggère que, chez ces personnes connues pour avoir un bas niveau de réservoir viral, la sécrétion du VIH dans le sperme provient vraisemblablement davantage d'une diffusion passive que d'une compartimentalisation.

### **3. Le tractus génital féminin**

La compartimentalisation dans le tractus génital féminin lors de l'infection chronique a également été objectivée par Adal *et al.* après analyse des séquences du gène *env* dans l'ARN-VIH de 17 femmes éthiopiennes [Adal *et al.* 2005]. D'autres études transversales ont aussi noté des degrés de compartimentalisation variables chez les femmes infectées non-traitées [Haaland *et al.* 2012 ; Bull *et al.* 2009]. Peu d'études longitudinales ont été effectuées pour analyser la temporalité de cette compartimentalisation. Des techniques de séquençage de l'ARN ou heteroduplex tracking assay ont été utilisées dans trois études longitudinales totalisant 16 femmes avec réplication sanguine [Poss *et al.* 1998, Sullivan *et al.* 2005 ; Bull *et al.* 2013]. Globalement, des variants génitaux génétiquement distincts des variants sanguins ont été retrouvés, en accord avec un effet de compartimentalisation. Cependant, ces variants génitaux ne persistaient pas dans le temps et étaient différents à chaque temps. Ces variants génitaux étaient en effet plus proches des variants sanguins au même temps que des variants génitaux du temps précédent. Ceci est en faveur d'une diffusion passive de variants sanguins, suivie d'une réplication limitée dans le temps au niveau génital.

L'ensemble de ces résultats suggère, comme chez l'homme, un double mécanisme à la détection du VIH dans les sécrétions cervicovaginales.

Dans le cas particulier des femmes contrôles du VIH, Landay *et al.* ont démontré que, malgré la persistance d'une virémie plasmatique de faible intensité, l'ARN-VIH est absent ou détecté à de très faibles niveaux dans les lavages cervicovaginaux [Landay *et al.* 2014].

#### 4. Le tractus digestif

Une récente étude a comparé le poids de chacun des compartiments anatomiques réservoir du VIH [Estes *et al.* 2017]. Une nécropsie de trois macaques infectés par SIV non traités a été réalisée et le réservoir a été quantifié par hybridation in situ pour quantifier l'ADN, l'ARN et la réplication productive de SIV. Le tissu digestif, les ganglions lymphatiques et la rate abritent 98,4% du réservoir viral (Figure 16).

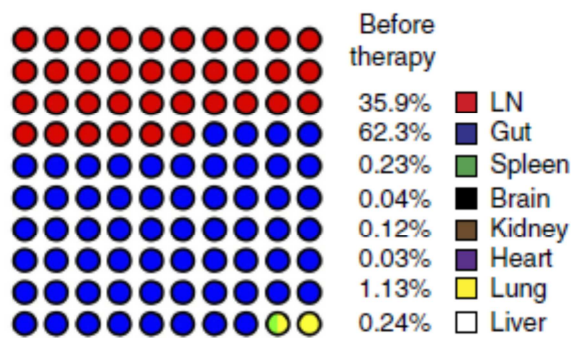


Figure 16. Représentation graphique de la proportion d'ARN viral associé aux cellules de chaque organe. Adaptée de Estes *et al.* 2017.

L'expression d'ARN viral est la plus fréquente dans le tissu digestif puis dans les ganglions lymphatiques.

La déplétion en lymphocytes T CD4+ est plus prononcée dans le GALT que dans le sang de personnes infectées de façon chronique [Guadalupe *et al.* 2003]. La déplétion en lymphocyte T CD4+ est très prononcée et similaire à celle des personnes en primo-infection. Le niveau d'ADN-VIH est semblable également à celui de la primo-infection [Avettand-Fenoel *et al.* 2008].

Au sujet de la diversité génétique, Rozera *et al.* ont constaté une augmentation de la diversité en infection chronique en comparant les séquences de la boucle V3 entre sang et tissu digestif chez 11 personnes en primo-infection et 6 en infection chronique, par séquençage à haut débit [Rozera *et al.* 2014]. Cette équipe a également analysé la compartimentalisation chez 6

personnes en primo-infection et 4 en infection chronique et a montré que celle-ci est plus fréquente en primo-infection (4/6) qu'en infection chronique (1/4). La compartimentalisation dans le GALT serait donc un évènement précoce associé à la divergence d'évolution des clones disséminants en primo-infection. La plupart des séquences sont en effet mêlées et ce, dans chacun des différents sous-groupes de variants. Avettand-Fenoel *et al.* ont comparé les séquences d'ADN-VIH obtenues à partir du rectum et des CMSP : la diversité génétique semblait plus élevée dans le rectum que dans le sang, mais ces variants étaient entremêlés génétiquement, suggérant des échanges entre les compartiments [Avettand-Fenoel *et al.* 2011].

**En résumé, au cours de l'infection chronique :**

- L'ARN et l'ADN-VIH dans le sang sont à un état d'équilibre inférieur aux niveaux de la primo-infection [Avettand-Fenoel *et al.* 2016]
- Un tiers des virus intégrés sont intacts [Bruner *et al.* 2016]
- Les TCM semblent contribuer majoritairement au réservoir sanguin [Brenchley *et al.* 2004]
- ARN et ADN-VIH sont toujours présents dans le sperme, le tissu digestif et les sécrétions cervicovaginales [Anderson *et al.* 2010 ; Bulle te al. 2013 ; Guadalupe *et al.* 2003]
- La diversité génétique est plus importante qu'en primo-infection dans tous les compartiments, que ce soit dans le sang, les sécrétions cervicovaginales, le sperme ou le tissu digestif [Lee *et al.* 2008 ; Rozera *et al.* 2013 ; Bull *et al.* 2013 ; Chaillon *et al.* 2017]
- Un effet de compartimentalisation des variants commence à être observé dans le sperme et les sécrétions cervicovaginales [Anderson *et al.* 2010, Bull *et al.* 2013]

### III. Succès virologique sous traitement antirétroviral

Le traitement antirétroviral a considérablement modifié le pronostic de l'infection à VIH. Ces associations de molécules antirétrovirales à différents mécanismes d'action ciblent la réplication virale active et permettent de la stopper. Une mesure de l'ARN-VIH dans le plasma sanguin inférieure au seuil de 50 copies/mL définit l'efficacité du traitement et correspond au succès virologique. Un succès virologique prolongé permet une restauration immunitaire, une diminution de l'inflammation et ainsi une quasi-normalisation de l'espérance de vie.

Nous allons donc décrire, les traitements antirétroviraux et leurs effets sur l'organisme. Cependant, on peut déjà noter que les traitements antirétroviraux actuels ne permettent pas l'éradication du virus car ils n'éliminent pas complètement le réservoir viral.

#### A. *Principe du traitement antirétroviral*

La prise en charge de l'infection par le VIH est un ensemble d'interventions, incluant une thérapie antirétrovirale, d'autres médicaments et une prise en charge psychosociale principalement. Empiriquement, à la suite des premiers essais sur les inhibiteurs de protéase [Danner *et al.* 2015], il a été démontré qu'une trithérapie antirétrovirale permet d'obtenir un succès virologique en moins de 6 mois chez la plupart des personnes vivant avec le VIH.

À l'échelle nationale, en 2010, il y avait 111500 personnes vivant avec le VIH suivies, 81% étaient sous traitement antirétroviral soit 90000 personnes traitées depuis plus de 6 mois, et 69% étaient en succès virologique soit 76900 personnes [Supervie *et al.* 2016]. À une échelle locale en 2016 au Trait d'Union, sur 1240 individus suivis, 96% étaient sous traitement antirétroviral soit 1195 personnes traitées, et 90% étaient en succès virologique soit 1121 personnes.

#### 1. Antirétroviraux et objectifs du traitement

Les antirétroviraux sont des médicaments à action directe contre différents éléments propres au virus. La difficulté rencontrée dans l'élaboration de ces composés est du même type que

celle rencontrée pour les molécules du domaine de l'oncologie : la spécificité est liée au fait que les rétrovirus ne possèdent que très peu de molécules qui leur sont propres, puisqu'ils détournent la machinerie cellulaire.

Ces différentes classes d'agents antirétroviraux agissent à différentes étapes du cycle de réplication du VIH (Figure 17) [Lasker *et al.* 2017].

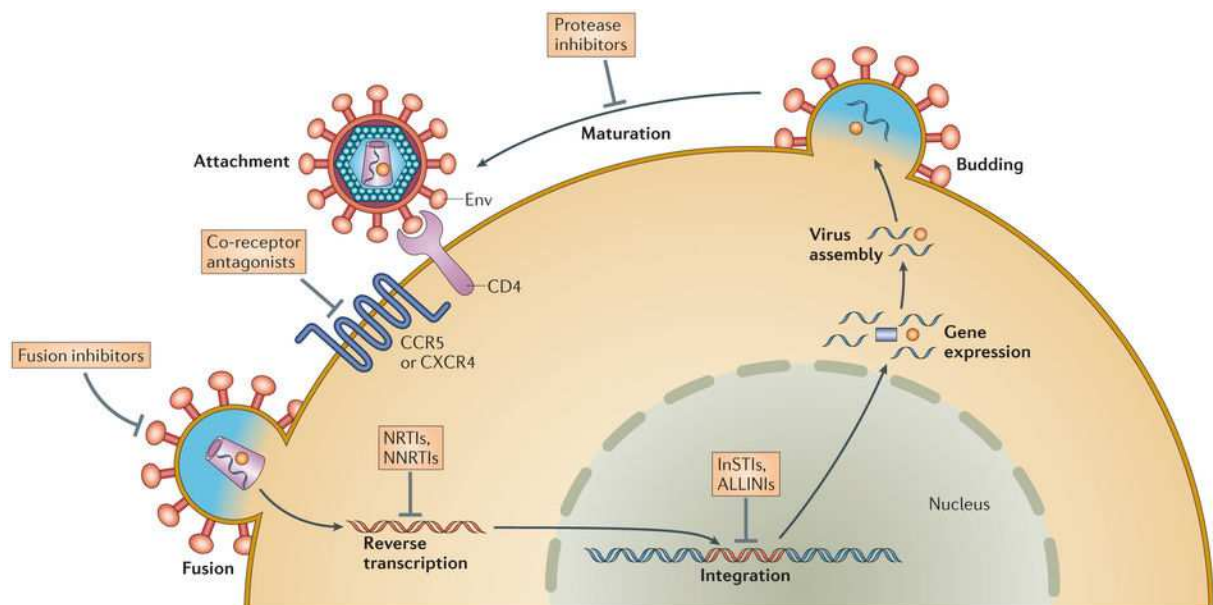


Figure 17. Représentation de l'étape d'action des antirétroviraux au long du cycle viral. Adaptée de Laskey *et al.* 2014.

Les médicaments agissant en pré-intégration sont Anti-CCR5, IF, INTI, INNTI et INI, la classe agissant en post-intégration est celle des IP.

### a) Les Inhibiteurs Nucléosidiques de la Transcriptase Inverse (INTI)

Les INTI sont des analogues structuraux des nucléosides naturels. Ils sont constitués de base pyrimidine ou purine associée à une entité sucre (le ribose). Il s'agit de : Zidovudine (AZT), Lamivudine (3TC), Stavudine (d4T), Abacavir (ABC), Didanosine (ddI), Emtricitabine (FTC) et le Ténofovir sous forme disoproxil fumarate (TDF) ou alafénamide (TAF) qui est un inhibiteur nucléotidique. Les INTI sont administrés sous forme de prodrogues non-phosphorylées, à l'exception du Ténofovir qui est monophosphorylé. Après un passage intracellulaire, les INTI sont phosphorylés en nucléotides triphosphates par les kinases cellulaires. Sous cette forme triphosphate, ils inhibent l'action de la transcriptase inverse par



inhibition de l'élongation de l'ADN viral et par leur propriété terminatrice de chaîne. Les INTI entrent donc en compétition avec les nucléotides cellulaires. Ils bloquent ainsi la fabrication d'ADN-VIH. Ce sont donc des inhibiteurs d'une phase précoce du cycle viral .

### *b) Les Inhibiteurs Non-Nucléosidiques de la Transcriptase Inverse (INNTI)*

Les INNTI sont des inhibiteurs non-compétitifs, directement actifs dans la cellule. Ces molécules sont actives uniquement sur le VIH-1 (et non sur le VIH-2). La classe des INNTI compte des inhibiteurs de première génération : la Névirapine (NVP) et l'Efavirenz (EFV), et de seconde génération : la Rilpivirine (RPV) et l'Etravirine (ETR). Leur action se fait par liaison directe à la transcriptase inverse dans une poche hydrophobe à proximité du site actif, de l'enzyme entraînant ainsi un effet allostérique qui rend l'enzyme inactive. La fixation d'un INNTI hors du site catalytique induit un changement conformationnel de la transcriptase inverse conduisant au déplacement des résidus aspartates catalytiques, bloquant ainsi l'étape chimique de polymérisation. En tant qu'inhibiteurs allostériques non compétitifs, ils ne modifient pas l'affinité de la transcriptase inverse pour les nucléotides cellulaires ni pour les INTI. Les molécules des deux classes (INTI et INNTI) ont donc des mécanismes complémentaires d'inhibition de la réplication virale lors d'une étape précoce et peuvent donc être associées.

### *c) Les Inhibiteurs de la Protéase (IP)*

Les IP sont des inhibiteurs du site actif de la protéase virale. Ils agissent en perturbant le processus de maturation des nouveaux virions. Les nouveaux virions ont ainsi une conformation différente des virions infectieux et sont donc non-infectieux. Ce sont donc des inhibiteurs agissant à une phase tardive de la réplication virale. En effet, les IP empêchent le clivage des précurseurs des polyprotéines gag et gag-pol en protéines structurales et enzymatiques. La mise au point des IP est basée sur la connaissance de la structure tridimensionnelle de la protéase et de ses sites de clivage. Les IP commercialisées inhibent le clivage des liaisons peptidiques en se fixant au niveau du site de liaison Phe-Pro du substrat de la protéase. On distingue plusieurs inhibiteurs de cette classe : le Saquinavir (SQV), l'Indinavir, le fosamprenavir (fosAPV), le Lopinavir (LPV), Atazanavir (ATV), Tipranavir

(TPV), Darunavir (DRV). Les dernières de ces molécules (TPV, ATV, DRV) ont été créées pour être actives sur les souches virales résistantes aux premiers IP commercialisés. L'association d'un inhibiteur du métabolisme du cytochrome P450 aux IP permet d'augmenter leur biodisponibilité systémique, en réduisant l'effet de premier passage hépatique. Du fait de la faible biodisponibilité des IP, il est nécessaire de booster leur administration par l'adjonction d'une faible dose de Ritonavir (RTV ou /r). Le RTV fut l'un de premiers IP disponibles, puissant inhibiteur du cytochrome P450, mais disposant d'une faible activité sur la protéase.

#### *d) L'Inhibiteur de Fusion (IF)*

Le virus entre dans la cellule en deux étapes, il y a fixation puis fusion des membranes pour permettre ensuite le passage de la capsid virale. Ceci est possible grâce à aux protéines de surface du virus (gp120 et gp41) et aux récepteurs CD4 et corécepteurs de la cellule hôte. L'Enfuvirtide (T20) est un composé peptidique qui agit au niveau de la gp120-gp41 comme faux substrat inhibant ainsi la fusion du VIH-1 à la cellule hôte mais le virus reste fixé sur la cellule. Il ne reconnaît pas la liaison gp105-gp36 (les protéines équivalentes du VIH-2), il n'est donc pas actif sur le VIH-2.

#### *e) L'inhibiteur d'entrée (Anti-CCR5)*

L'Anti-CCR5 est un inhibiteur de l'entrée du virus, plus précisément de l'attachement du virion à sa cellule cible. Après liaison de la gp120 au récepteur CD4 de la cellule hôte, la gp120 subit une modification conformationnelle qui permet l'accès d'une boucle variable de la protéine (boucle V3) pour la liaison à un corécepteur. Ce corécepteur peut être soit le CCR5 soit le CXCR4 en fonction de la séquence de la boucle V3, c'est ce que l'on appelle le tropisme du virus. Le Maraviroc (MVC) seul Anti-CCR5 commercialisé se fixe sur le corécepteur CCR5 et empêche sa reconnaissance par la gp120. Afin d'utiliser le MVC en clinique, il est donc nécessaire de définir au préalable le tropisme du virus. Si celui-ci a un tropisme mixte ou pour le corécepteur CXCR4, le MVC ne pourra pas être utilisé.

#### *f) Les Inhibiteurs de l'Intégrase (II)*

Le raltégravir, l'elvitégravir et le dolutégravir sont les molécules de la classe thérapeutique antirétrovirale ciblant l'intégrase du VIH, enzyme nécessaire à l'intégration du génome du VIH dans l'ADN cellulaire de l'hôte [Podany *et al.* 2017 ; Mouscadet *et al.* 2010]. Elles appartiennent à la famille des inhibiteurs sélectifs du transfert de brins et agissent en se fixant sur le complexe PIC, constitué notamment de l'intégrase et de l'ADN viral à proximité de l'extrémité 3'. Ils n'empêchent pas la réaction de 3'-processing, mais bloquent sélectivement l'étape de transfert de brins. Les concentrations inhibitrices de ces molécules sont de l'ordre nanomolaire *in vitro*. Les II sont actifs indépendamment du tropisme des virus VIH-1 et VIH-2 (CCR5 et CXCR4) et, sur les virus résistants aux autres classes thérapeutiques antirétrovirales. Ces molécules ont montré leur puissance d'action avec une diminution de la charge virale d'au moins 2 log en monothérapie ainsi que dans les essais cliniques.

Les II agissent au niveau du site catalytique de l'enzyme (Figure 18), situé dans le domaine catalytique de l'intégrase (CCD, *core catalytic domain*) [Maes *et al.* 2012]. Ce site est formé par une triade d'acides aminés catalytiques (DDE) et de deux cofacteurs ioniques ( $Mg^{2+}$ ). L'intégrase possède également d'autres résidus (Y143, Q148 et K159) capables de lier l'ADN viral via des motifs de la région U5 du LTR [Kessl *et al.* 2008].

Après la réaction de 3'-processing, la liaison de l'ADN viral à l'intégrase va permettre [Chen *et al.* 2008] :

- la coordination complète des deux ions  $Mg^{2+}$  du site catalytique ;
- la formation d'une poche hydrophobe à partir de la boucle flexible (Q140 à Q149).

Ceci va permettre :

- la fixation de l'II via une interaction hydrophobe avec le groupement benzyl de l'II et une interaction avec la paire G:C de l'ADN viral (en déplaçant ce dernier hors du site actif de l'enzyme) ;
- la chélation des deux ions  $Mg^{2+}$  du site actif.

D'autres résidus interviennent dans la liaison des inhibiteurs au niveau du site actif (de G140 à K159) [Mouscadet *et al.* 2009].

A noter que l'interaction des II avec l'intégrase se fait lors du complexe de pré-intégration, dans lequel l'intégrase est sous forme tétramérique [Craigie. 2012].

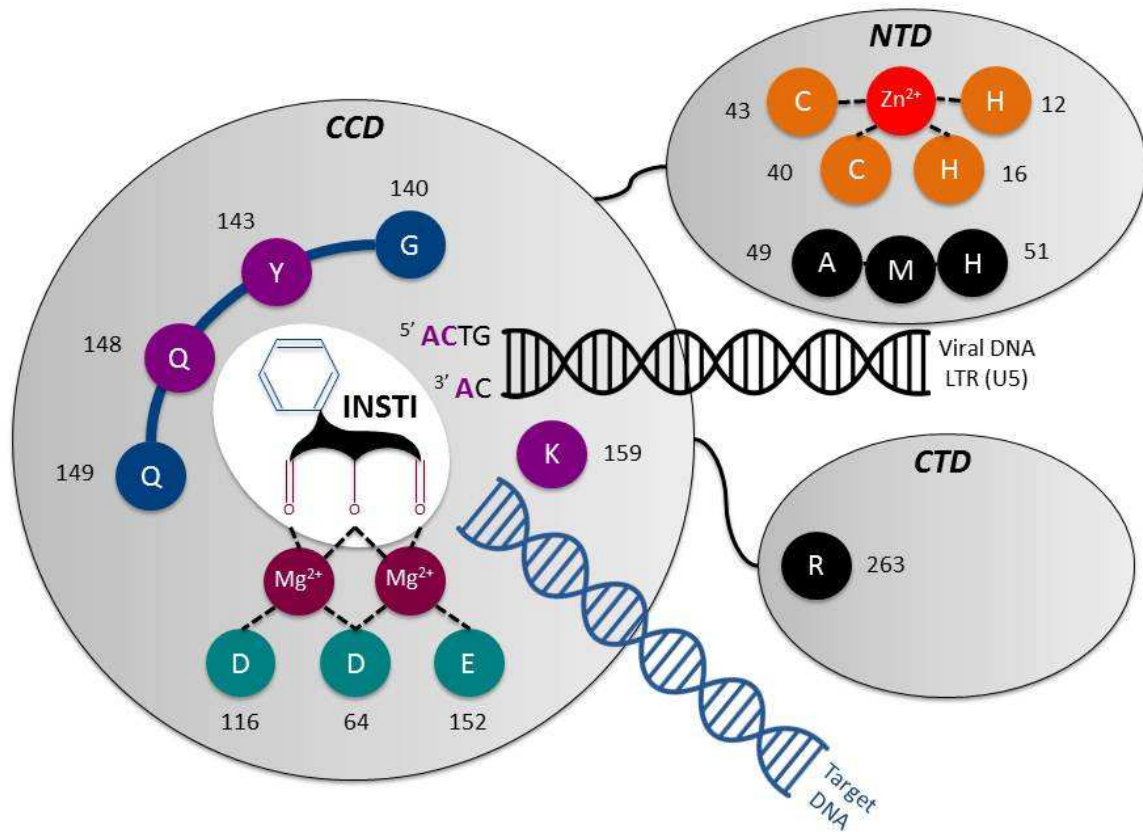


Figure 18. Résidus importants dans l'interaction II-intégrase.

On note : en violet les résidus qui lient l'ADN viral, en bleu foncé les résidus qui lient les II et en pourpre les ions cofacteurs catalytiques chélatés par les II.

Les objectifs du traitement antirétroviral, à la fois multiples et découlant les uns des autres sont [Morlat, 2017. Rapport sur la prise en charge des personnes vivant avec le VIH] :

- (1) de diminuer la réplication virale, ce qui est quantifié par la charge virale plasmatique correspondant au nombre de copies d'ARN-VIH présents dans le plasma par PCR, ceci reflétant le nombre de virions présents dans l'organisme. L'objectif est que cette charge virale passe en-dessous du seuil de détection des techniques actuellement commercialisées (entre 20 et 50 copies/mL) ;
- (2) d'empêcher la progression vers le stade SIDA en permettant ensuite une augmentation du taux de lymphocytes T CD4+, idéalement  $>500$  cellules/mm<sup>3</sup> ;
- (3) d'empêcher la survenue précoce de maladies à composante inflammatoire comme les maladies cardiovasculaires, en diminuant l'activation immunitaire généralisée ;
- (4) de prévenir au maximum l'apparition de résistance aux antirétroviraux ;
- (5) d'avoir la meilleure tolérance possible, à court, moyen et long terme ;
- (6) d'améliorer ou de préserver de la qualité de vie ;
- (7) et à une échelle communautaire, d'empêcher la transmission du virus.

Les lignes de traitements antirétroviraux sont des combinaisons de schémas thérapeutiques utilisés dans la prise en charge de personnes infectées par le VIH. Les schémas thérapeutiques donnés en première intention chez des personnes naïves de traitement antirétroviral (premières lignes) visent à rendre la charge virale plasmatique indétectable ( $< 50$  copies/mL) au plus tard 6 mois après le début du traitement. Au cours de cette période, des mesures intermédiaires de la charge virale sont réalisées pour s'assurer que cet objectif est susceptible d'être atteint. D'abord à un mois, date à laquelle la charge virale doit avoir baissé d'au moins 2 log copies/ml, puis à 3 mois, date à laquelle la charge virale doit être inférieure à 400 copies/mL. Le non-respect de ces objectifs intermédiaires témoigne presque toujours d'une mauvaise observance, parfois d'interactions médicamenteuses.

L'efficacité immunovirologique d'un traitement est mesurée par deux paramètres : la charge virale, correspondant au nombre de copies de virus VIH dans le sang et, indirectement, le nombre de lymphocytes T CD4+. La réplication virale est contrôlée si la charge virale est indétectable sous traitement (c'est-à-dire inférieure à la limite de détection de la technique utilisée). L'efficacité immunologique du traitement s'observe par la remontée des lymphocytes T CD4+ jusqu'à une normalisation avec un nombre supérieur à 500/mm<sup>3</sup>.

## **2. Combinaisons antirétrovirales**

La combinaison des différentes molécules antirétrovirales fait l'objet d'études cliniques permanentes depuis ces 25 dernières années et les résultats de ces différents essais sont analysés par différents groupes d'experts nationaux et internationaux. La plupart des combinaisons retenues sont des trithérapies (Tableau 3). Ainsi, les recommandations françaises de prise en charge des personnes vivant avec le VIH intègrent un chapitre sur les différentes combinaisons antirétrovirales recommandées en fonction du contexte clinique [Morlat, 2017. Rapport sur la prise en charge des personnes vivant avec le VIH]. La plupart des directives nationales sur le traitement du VIH se conforment aux recommandations de l'OMS relatives aux traitements de première intention et au suivi clinique systématique.

**TABLEAU 3. RESUME DES PRINCIPALES COMBINAISONS THERAPEUTIQUES ETUDIEES DANS LA LITTERATURE.**

| <b>Schéma thérapeutique utilisé</b>    | <b>Combinaison retenue</b>                                      | <b>Résultats d'efficacité première ligne (personnes naïves de traitement)</b> | <b>Résultats d'efficacité seconde ligne (personnes prétraitées en succès virologique)</b> | <b>Exemples de publications</b>   |
|--|---|---|---|---|
| <b>Monothérapie</b>                    | 1 IP  | Efficacité moindre  | Efficacité limitée<br>À discuter au cas par cas   | Arribas <i>et al.</i> 2010<br>Valantin <i>et al.</i> 2012   |
| <b>Bithérapie</b>                      | 2 agents de deux classes pharmacologiques différentes           | Efficacité moindre  | Efficacité limitée<br>À discuter au cas par cas   | Katlama <i>et al.</i> 2014<br>Monteiro <i>et al.</i> 2014<br>Acchra <i>et al.</i> 2016  |
| <b>Trithérapie</b>                     | 2 INTI + 1 agent issu d'une autre classe pharmacologique        | Efficacité  | Efficacité  | Eron <i>et al.</i> 2010<br>Molina <i>et al.</i> 2010<br>Cahn <i>et al.</i> 2013<br>Raffi <i>et al.</i> 2013<br>Palella <i>et al.</i> 2014 |
| <b>Quadrithérapie ou Pentathérapie</b> | 2 INTI + 2 ou 3 agents issus d'une autre classe pharmacologique | Efficacité similaire à la trithérapie   | Efficacité similaire à la trithérapie<br>(Intérêt en cas de multi-résistance)             | Chéret <i>et al.</i> 2015<br>Ananworanich <i>et al.</i> 2015<br>Morand-Joubert <i>et al.</i> 2012   |

Les différentes molécules disponibles pour la réalisation de ces combinaisons sont présentées dans le Tableau 4. Les antirétroviraux sont le plus souvent administrés par voie orale sauf l'enfuvirtide (Fuzeon®, l'inhibiteur de fusion) dont la nature polypeptidique oblige l'injection sous-cutanée et la zidovudine (AZT) qui existe également en injection intraveineuse mais qui n'est utilisée que dans la prévention de la transmission mère-enfant.

**TABLEAU 4. LISTE DES MOLECULES ANTIRETROVIRALES COMMERCIALISEES EN FRANCE EN 2017. ADAPTE DE MORLAT 2017.**

| DCI                                  | Abréviation | Spécialités | Précautions d'emploi   |
|--------------------------------------|-------------|-------------|--|
| <b>INTI</b>                          |             |             |  |
| <b>Abacavir</b>                      | ABC         | Ziagen®     | Individu négatif pour HLA-B*5701   |
| <b>Emtricitabine</b>                 | FTC         | Emtriva®    | En cas de co-infection VHB<br>Adaptation à l'insuffisance rénale               |
| <b>Didanosine</b>                    | ddI         | Videx®      | Toxicité mitochondriale<br>Adaptation à l'insuffisance rénale                  |
| <b>Lamivudine</b>                    | 3TC         | Epivir®     | En cas de co-infection VHB<br>Adaptation à l'insuffisance rénale               |
| <b>Zidovudine</b>                    | AZT         | Retrovir®   | Toxicité mitochondriale et hématologique<br>Adaptation à l'insuffisance rénale |
| <b>Ténofovir disoproxil fumarate</b> | TDF         | Viread®     | Toxicité rénale  |
| <b>Ténofovir alafénamide</b>         | TAF         | /           | Toxicité rénale réduite  |
| <b>INNTI</b>                         |             |             |  |
| <b>Efavirenz</b>                     | EFV         | Sustiva®    | Toxicité neurologique<br>Contre-indication 1er trimestre grossesse             |
| <b>Etravirine</b>                    | ETR         | Intélenç®   |  |
| <b>Névirapine</b>                    | NVP         | Viramune®   | Hépatotoxicité chez le naïf avec CD4 élevés                                    |
| <b>Rilpivirine</b>                   | RPV         | Edurant®    | Interaction avec les inhibiteurs de la pompe à protons                         |
| <b>IP</b>                            |             |             |  |
| <b>Atazanavir</b>                    | ATV         | Reyataz®    | Hyperbilirubinémie<br>Allongement PR   |
| <b>Darunavir</b>                     | DRV         | Prezista®   | Risque de rash   |
| <b>Fosamprénavir</b>                 | fosAMP      | Telzir®     | Risque de rash   |
| <b>Lopinavir +ritonavir</b>          | LPV/r       | Lopinavir®  | Douleurs abdominales<br>Allongement QT   |
| <b>Saquinavir</b>                    | SQV         | Invirase®   | Allongement QT   |



|                                   |           |            |                                |
|-----------------------------------|-----------|------------|--------------------------------|
| <b>Tipranavir</b>                 | TPV       | Aptivus®   | Cytolyse hépatique             |
| <b>Ritonavir</b>                  | RTV ou /r | Norvir®    | (booster)                      |
| <b>IF</b>                         |           |            |                                |
| <b>Enfuvirtide</b>                | T20       | Fuzeon®    | Réactions au point d'injection |
| <b>IE</b>                         |           |            |                                |
| <b>Maraviroc</b>                  | MVC       | Celsentri® | Virus à tropisme CCR5          |
| <b>II</b>                         |           |            |                                |
| <b>Raltegravir</b>                | RAL       | Isentress® |                                |
| <b>Elvitegravir</b>               | EVG       | /          |                                |
| <b>Dolutegravir</b>               | DTG       | Tivicay®   |                                |
| <b>PRESENTATIONS COMBINEES</b>    |           |            |                                |
| <b>AZT/3TC</b>                    |           | Combivir®  | Non recommandée                |
| <b>AZT/3TC/ABC</b>                |           | Trizivir®  | Non recommandée                |
| <b>ABC/3TC</b>                    |           | Kivexa®    |                                |
| <b>FTC/TDF</b>                    |           | Truvada®   |                                |
| <b>FTC/TAF</b>                    |           | Odefsey®   |                                |
| <b>FTC/TDF/EFV</b>                |           | Atripla®   |                                |
| <b>FTC/TDF/RPV</b>                |           | Eviplera®  |                                |
| <b>ABC/3TC/DTG</b>                |           | Triumeq®   |                                |
| <b>FTC/TDF/EVG/c (cobisistat)</b> |           | Stribild®  |                                |
| <b>FTC/TAF/EVG/c (cobisistat)</b> |           | Genvoya®   |                                |

Les différentes combinaisons d'antirétroviraux recommandées en traitement de première ligne comprennent trois médicaments : 2 INTI et 1 INNTI ou 1 II ou 1 IP/r (Tableau 5).

**TABLEAU 5. COMBINAISONS ANTIRETROVIRALES RECOMMANDEES EN PREMIERE INTENTION. ADAPTE DE MORLAT 2017.**

| <b>INTI</b>    | <b>3<sup>ème</sup><br/>agent</b> | <b>Nb<br/>prise par jour</b> | <b>cp/Nb</b> | <b>Commentaires</b>  |
|----------------|----------------------------------|------------------------------|--------------|--|
| <b>2 INTI</b>  | <b>1 INNTI</b>                   |                              |              |  |
| <b>TDF/FTC</b> | RPV                              | 1/1 ou 2/1*                  |              | Uniquement si CV < 5 log copies/ml.<br>Précaution si CD4 < 200/mm <sup>3</sup><br>Précaution si clairance de la créatinine < 80 ml/min.<br>Surveillance rénale.<br>Prise au cours d'un repas. Association à un IPP contre-indiquée   |
| <b>2 INTI</b>  | <b>1 II</b>                      |                              |              |  |
| <b>TDF/FTC</b> | DTG                              | 2/1                          |              | Précaution si clairance de la créatinine < 80 ml/min.<br>Surveillance rénale.<br>Peu d'interactions médicamenteuses avec le dolutegravir   |
| <b>ABC/3TC</b> | DTG                              | 1/1 ou 2/1*                  |              | Uniquement si HLA-B*5701 négatif<br>Peu d'interactions médicamenteuses avec le dolutegravir  |
| <b>TAF/FTC</b> | EVG/c                            | 1/1                          |              | Association contre-indiquée si clairance de la créatinine < 30 ml/min.<br>Interactions médicamenteuses avec le cobicistat  |
| <b>TDF/FTC</b> | RAL                              | 3/2                          |              | Précaution si clairance de la créatinine < 80ml/min.<br>Surveillance rénale.<br>Pas d'interaction médicamenteuse avec le RAL   |
| <b>2 INTI</b>  | <b>1 IP/r</b>                    |                              |              |  |
| <b>TDF/FTC</b> | DRE/r                            | 3/1                          |              | Intérêt particulier dans les indications suivantes : immunodépression profonde, charge virale plasmatique élevée, nécessité d'entreprendre un traitement rapidement, grossesse.<br>Précaution si clairance de la créatinine < 80 ml/min.<br>Surveillance rénale.<br>Interactions médicamenteuses avec le RTV |

\* Si 2 INTI sous forme générique

A une échelle locale, les schémas thérapeutiques les plus fréquemment utilisés dans la file active du Trait d'Union en 2016 étaient : 2 INTI + 1 INNTI (37%) et 2 INTI + 1 II (31%) (Tableau 6) [Rey, 2017 Rapport d'activité, Le Trait d'Union].

**TABLEAU 6. ÉVOLUTION DES COMBINAISONS ANTIRETROVIRALES UTILISEES AU TRAIT D'UNION. ADAPTE DE REY 2017.**

| Schéma thérapeutique actuel | 2010       |            | 2011       |            | 2012       |            | 2013        |            | 2014        |            | 2015        |            | 2016        |             |
|-----------------------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|-------------|------------|-------------|------------|-------------|------------|-------------|-------------|
|                             | N          | %          | N          | %          | N          | %          | N           | %          | N           | %          | N           | %          | N           | %           |
| <b>2N + 1IIb</b>            | -          | -          | -          | -          | -          | -          | -           | -          | -           | -          | -           | -          | <b>70</b>   | <b>5.9</b>  |
| <b>2N + 1IPb</b>            | 279        | 31,6       | 308        | 31,8       | 282        | 29,5       | 250         | 23,9       | 190         | 18         | 160         | 13,7       | <b>156</b>  | <b>13</b>   |
| <b>2N + 1NN</b>             | 279        | 31,6       | 298        | 30,7       | 351        | 36,7       | 470         | 45         | 520         | 48         | 497         | 42,7       | <b>441</b>  | <b>37</b>   |
| <b>2N + 1II</b>             | 105        | 11,9       | 102        | 10,5       | 96         | 10         | 99          | 9,5        | 141         | 13         | 284         | 24,4       | <b>297</b>  | <b>24,8</b> |
| <b>2N + 1IP</b>             | 52         | 5,9        | 53         | 5,6        | 44         | 4,6        | 32          | 3,1        | 31          | 3          | 22          | 1,9        | <b>20</b>   | <b>1,7</b>  |
| <b>1N + 1NN</b>             | 17         | 1,9        | 17         | 1,8        | 13         | 1,4        | 13          | 1,2        | 11          | 1          | 11          | 1          | <b>16</b>   | <b>1,3</b>  |
| <b>1N + 1IPb</b>            | 16         | 1,8        | 11         | 1,1        | 8          | 0,8        | 8           | 0,8        | 8           | 0,8        | 10          | 0,9        | <b>8</b>    | <b>0,7</b>  |
| <b>1N + 1II</b>             | -          | -          | -          | -          | -          | -          | -           | -          | -           | -          | 9           | 0,8        | <b>23</b>   | <b>1,9</b>  |
| <b>1IPb</b>                 | 20         | 2,3        | 22         | 2,3        | 20         | 2,1        | 15          | 1,4        | 11          | 1          | 12          | 1          | <b>13</b>   | <b>1,1</b>  |
| <b>1IP + 1II</b>            | 8          | 0,9        | 22         | 2,3        | 20         | 2,1        | 14          | 1,2        | 20          | 1,9        | 23          | 2          | <b>12</b>   | <b>1</b>    |
| <b>1NN + 1II</b>            | -          | -          | 14         | 1,4        | 16         | 1,7        | 22          | 2,1        | 30          | 2,8        | 41          | 3,5        | <b>51</b>   | <b>4,3</b>  |
| <b>1NN + 1IPb</b>           | 8          | 0,9        | 13         | 1,3        | 12         | 1,3        | 15          | 1,4        | 12          | 1,1        | 13          | 1,1        | <b>11</b>   | <b>0,9</b>  |
| <b>2N + 1IE</b>             | -          | -          | 11         | 1,1        | 11         | 1,2        | 12          | 1,1        | 13          | 1,2        | 11          | 0,9        | <b>8</b>    | <b>0,7</b>  |
| <b>1IPb + 1II</b>           | -          | -          | 11         | 1,1        | 12         | 1,3        | 16          | 1,5        | 16          | 1,5        | 19          | 1,6        | <b>18</b>   | <b>1,5</b>  |
| <b>3N</b>                   | 10         | 1,1        | 8          | 0,8        | 4          | 0,4        | -           | -          | -           | -          | -           | -          | -           | -           |
| <b>1II</b>                  | -          | -          | -          | -          | -          | -          | -           | -          | -           | -          | -           | -          | <b>16</b>   | <b>1,3</b>  |
| <b>Autres</b>               | 82         | 9,3        | 79         | 8,2        | 34         | 3,4        | 38          | 3,8        | 70          | 6,8        | 53          | 4,5        | <b>35</b>   | <b>2,9</b>  |
| <b>Total</b>                | <b>883</b> | <b>100</b> | <b>969</b> | <b>100</b> | <b>964</b> | <b>100</b> | <b>1165</b> | <b>100</b> | <b>1044</b> | <b>100</b> | <b>1095</b> | <b>100</b> | <b>1195</b> | <b>100</b>  |

Une diminution de la prescription de la classe des IP depuis 2012, et de celle des INNTI depuis 2014 est notée au profit de la prescription des II depuis 2014 (Figure 19) [Rey, 2017 Rapport d'activité, Le Trait d'Union].

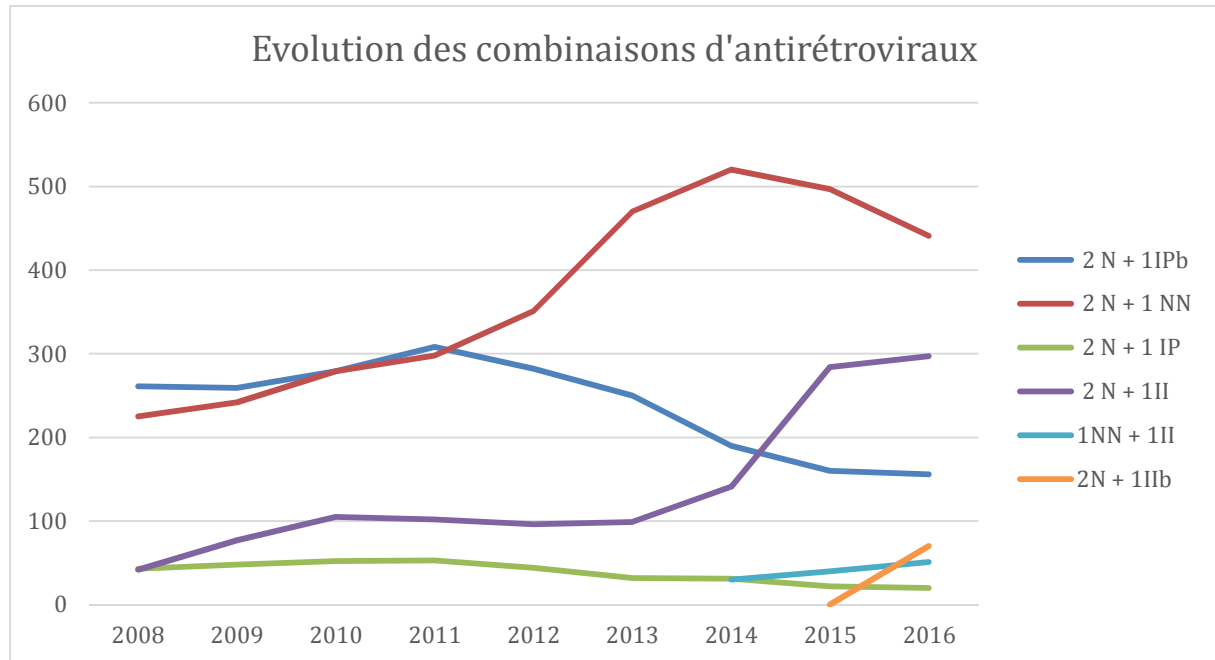


Figure 19. Évolution des schémas thérapeutiques utilisés au Trait d'Union au cours du temps. Adaptée de Rey 2017.

Cette diminution de la prescription des IP et des INNTI, peut s'expliquer par la mise sur le marché de nouveaux II qui ont l'avantage d'avoir un meilleur profil de tolérance et d'être disponibles sous forme combinée (Figure 20). L'augmentation de prescription des II est principalement liée à la mise sur le marché en 2014 du dolutegravir (DTG). Ainsi, en 2016, 325 personnes vivant avec le VIH suivies au Trait d'Union avait une combinaison incluant du DTG [Rey, 2017 Rapport d'activité, Le Trait d'Union].

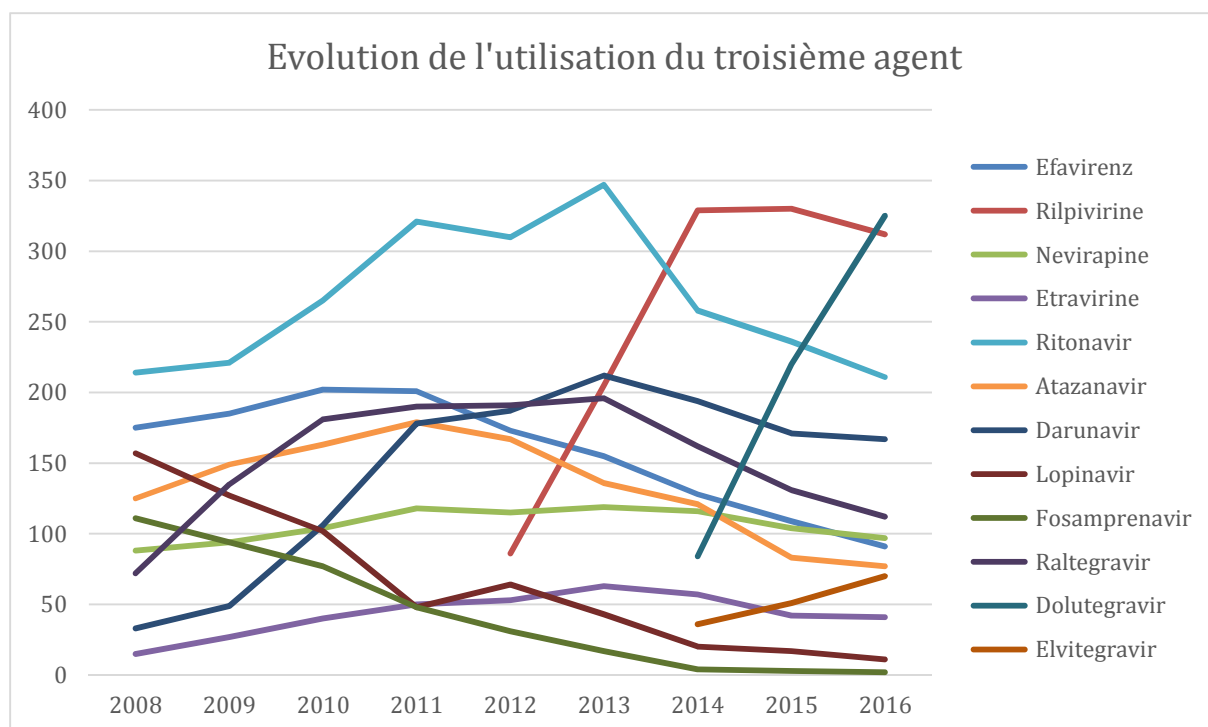


Figure 20. Évolution de la prescription des molécules antirétrovirales utilisées au Trait d'Union au cours du temps. Adaptée de Rey 2017.

### 3. Observance du traitement

L'observance est un comportement de prise du traitement avec assiduité et régularité optimales, selon les conditions prescrites et expliquées par le médecin. En d'autres termes, c'est le degré de concordance entre le comportement d'un individu (en termes de prises médicamenteuses, de suivi du régime thérapeutique ou de changement de style de vie) et les recommandations médicales.

L'adhésion correspond à l'ensemble des conditions (motivation, acceptation, information) qui permettent l'observance et nécessite la mobilisation du patient. Elle est jugée par l'adéquation des perceptions du patient aux perceptions du médecin et du traitement. Il s'agit de l'appropriation par le patient du discours du médecin.

L'observance représente un des éléments déterminants de la suppression virale et du succès thérapeutique. Le défaut d'observance expose à l'apparition de souches résistantes du VIH qui peuvent entraver l'efficacité des options thérapeutiques ultérieures. Paterson *et al.* ont démontré qu'une observance de 95 % ou davantage était nécessaire pour supprimer l'activité virale tout en prévenant l'apparition de résistances [Paterson *et al.* 2000]. Récemment il a

également été montré que l'observance optimale dans les 4 premiers mois de traitement influence la réponse thérapeutique à long terme (au-delà de 10 ans) [Protopopescu *et al.* 2017]. Il est donc nécessaire d'obtenir de la part des personnes une observance optimale dès les premières prises de traitement. Les facteurs susceptibles d'influer sur l'observance sont multiples. On retrouve les contraintes de prise du traitement ou ses effets indésirables, essentiellement ceux perçus par le patient, son adhésion à la stratégie thérapeutique, ses conditions de vie et à leur évolution, la présence éventuelle d'une dépression, l'organisation du système de soins (compatibilité des horaires de consultation et de délivrances des médicaments avec le mode de vie du patient, ruptures de stock dans les centres de dispensation).

La prise optimale d'un traitement antirétroviral à vie nécessite, selon les personnes vivant avec le VIH, « d'avoir été bien informé, d'être entendu et pris en compte, et d'avoir un **traitement simple** » [Gantner *et al.* 2015]. Actuellement, le stade ultime du « traitement simple » est le comprimé unique journalier. L'utilisation des trithérapies en comprimé unique (« single tablet regimen » : STR) est une option de premier choix recommandée chez les patients naïfs et prétraités [Morlat, 2017. Rapport sur la prise en charge des personnes vivant avec le VIH]. La première trithérapie en comprimé unique associant emtricitabine/ténofovir/efavirenz (FTC/TDF/EFV) a été commercialisée en 2008. Les STR ont montré un impact positif sur l'observance au traitement antirétroviral, la qualité de vie des patients et une diminution des coûts de traitement [Bernardini *et al.* 2013 ; Rao *et al.*, 53rd ICAAC, 2013, Denver, Presentation H-1464 ; Llibre *et al.*, 2011 ; Nachega *et al.*, 2011]. Les traitements en comprimé unique journalier répondent à ces critères, et correspondaient en 2016 à près de la moitié des traitements prescrits au Trait d'Union.

#### **4. Effets indésirables des antirétroviraux**

Les antirétroviraux présentent tous une toxicité responsable de différents effets indésirables. Ces effets sont bénins ou graves, diffèrent selon le moment de leur apparition et peuvent être des effets de classe ou de molécule. Selon la période d'apparition, on distingue les effets indésirables à court, moyen et long terme.

Les effets indésirables à court terme surviennent quelques jours à quelques semaines après le début du traitement et sont très souvent réversibles à l'arrêt du traitement.

D'autres effets indésirables apparaissent à plus longue échéance, comme la lipodystrophie et sont difficilement réversibles. La tolérance des médicaments antirétroviraux a considérablement été améliorée par la mise sur le marché de nouvelles molécules [Kanters *et al.* 2016].

Les effets indésirables les plus fréquents à court terme sont principalement :

- les atteintes cutanées comprenant une éruption cutanée, une hypersensibilité, l'apparition de nodules sous-cutanés, et autres. Ils concernent des molécules comme l'ABC, la NVP ou le T20 ;
- la toxicité hématologique comprend l'anémie, la neutropénie, un saignement spontané avec l'apparition d'hématomes chez les hémophiles. Ils concernent des molécules comme l'AZT ou le TPV ;
- les troubles digestifs sont en général du type diarrhées, nausées ou vomissements. Ces effets peuvent survenir avec toutes les molécules, mais particulièrement certains IP ;
- les effets neuropsychiques comprennent vertiges, troubles du sommeil (insomnie, somnolence), de perturbations de l'activité onirique (cauchemars, rêves anormaux), de troubles de l'attention et de la mémoire dont l'incidence diminue après plusieurs semaines à plusieurs mois de traitement. Ils ont été largement décrits pour l'EFV, et dans une moindre mesure pour la RPV et le DTG ;
- l'hépatotoxicité sous la forme cytolysé hépatique et l'hyperbilirubinémie sont retrouvées avec plusieurs classes mais en particulier la NVP, la RPV et l'ATV.
- la néphrotoxicité rassemble lithiases urinaires, coliques néphrétiques et atteintes tubulaires. Ces effets concernent principalement le TDF, l'IDV et à un niveau moindre l'ATV.

Les effets à moyen terme, comme la toxicité mitochondriale des premiers INTI avec la lipodystrophie, ou à long terme, comme les troubles métaboliques, sont, eux, le plus souvent permanents. Les facteurs de risque cardiovasculaires, ayant plusieurs étiologies, sont responsables de la morbidité et de la mortalité chez les patients en succès virologiques.

Le sur-risque cardiovasculaire chez les personnes vivant avec le VIH peut avoir trois origines : (1) une fréquence plus élevée des facteurs de risque traditionnels [Reinsch *et al.* 2012], en particulier le tabagisme [Duval *et al.* 2008], (2) les effets propres liés à l'infection

par le VIH [El-Sadr *et al.* 2006] et (3) l'exposition aux antirétroviraux [Bavinger *et al.* 2013 ; Smith *et al.* 2010] .

En effet, les médicaments antirétroviraux contribuent à ce sur-risque cardiovasculaire par le biais de plusieurs mécanismes.

Des anomalies métaboliques sont générées par le biais de la toxicité mitochondriale de certains antirétroviraux. La toxicité mitochondriale est liée à l'inhibition de la polymérase gamma des mitochondries par les INTI. Cette toxicité est corrélée à l'absence de sélectivité pour la transcriptase inverse du VIH entraînant une diminution de la quantité d'ADN mitochondrial [Katuda *et al.* 1999 ; Birkus *et al.* 2002]. La diminution de l'activité mitochondriale perturbe notamment les métabolismes lipidiques et glucidiques.

Pour expliquer ces anomalies lipidiques, plusieurs cofacteurs semblent intriqués. Le VIH joue un rôle en créant un profil pro-athérogène avec une diminution du cholestérol total (HDL et LDL), une modification qualitative des LDL, avec une augmentation des petites particules de LDL, et une élévation des triglycérides [Riddler *et al.* 2003 ; Grunfeld *et al.* 1992]. Les différentes classes pharmacologiques ont une action variable sur la lipidémie.

En résumé, deux facteurs peuvent expliquer le sur-risque cardiovasculaire sur lequel le traitement antirétroviral peut agir. Tout d'abord, le VIH lui-même a un impact cardiovasculaire négatif, lié à sa réplication pro-inflammatoire. Cet impact est diminué par le traitement antirétroviral, qui diminue la réplication virale et la remontée de l'immunité. Ensuite, certains principes actifs ont un impact cardiovasculaire négatif par la survenue d'anomalies métaboliques. Ces effets métaboliques sont dépendants de la classe pharmacologique et sont plus marqués au sein d'une même classe chez les molécules les plus anciennes. Par exemple, les INTI de première génération ont une absence de sélectivité plus marquée vis-à-vis de la transcriptase inverse et inhibent également la polymérase gamma mitochondriale. L'inhibition de cette polymérase, impliquée dans la synthèse d'ATP et le cycle de Krebs, induit des effets secondaires métaboliques marqués. Un autre exemple d'anomalies métaboliques est celui induit par les IP, et dont le mécanisme n'est pas défini. Ces anomalies, accompagnées d'un sur-risque cardiovasculaire, surviennent essentiellement avec les IP de première génération.



## 5. Pronostic de l'infection sous traitement antirétroviral

Dans la collaboration européenne de cohortes (« Collaboration of Observational HIV Epidemiological Research Europe »), la mortalité des hommes ayant un nombre de lymphocytes T CD4  $> 500/\text{mm}^3$  depuis plus de 3 ans était similaire à celle des hommes de la population générale [Lewden *et al.* 2012]. Plusieurs études évaluant la mortalité chez des patients en succès immunovirologique ont été réalisées. Les études SMART et ESPRIT n'ont pas montré de risque de mortalité augmenté, notamment lié aux événements SIDA, chez les patients ayant un taux de CD4 supérieur à  $500/\text{mm}^3$  [Rodger *et al.* 2013]. Les résultats combinés des cohortes ANRS CO8 APROCO-COPILOTE et CO3 AQUITAINE ont montré que les patients ayant un taux de CD4 supérieur à  $500/\text{mm}^3$  depuis plus de 5 ans ont un risque de survenue d'évènements cliniques non-SIDA, comme les comorbidités cardiovasculaires, comparable à celui de la population non infectée par le VIH [Lewden *et al.* 2007].

Ainsi, les maladies cardiovasculaires sont la première cause de mortalité des personnes vivant avec le VIH ayant un taux de CD4  $>500 /\text{mm}^3$  en France en 2010 [Morlat *et al.* 2014].

### ***B. Diversité virale et réservoirs sous traitement efficace***

#### **1. Compartiment sanguin**

##### ***a) Cinétique de décroissance de l'ARN-VIH***

Sous traitement antirétroviral bien observé, la virémie décroît jusqu'à passer sous le seuil des techniques de quantification actuelles. La décroissance de la virémie a été modélisée (Figure 21), elle est multiphasique car elle reflète l'élimination des différentes populations cellulaires réservoirs [Palmer *et al.* 2011]

La première phase correspond à l'élimination des virions libres et à la lyse des lymphocytes T CD4+ activés producteurs de virions avec une demi-vie courte (1,6 jours) [Perelson *et al.* 1996]. Une deuxième phase, plus lente, correspond au *turn-over* des populations cellulaires infectées : les lymphocytes T CD4+ partiellement activés, les macrophages et les cellules

dendritiques à demi-vie plus longue que les lymphocytes T CD4 activés (1 à 4 semaines) [43, 229, 258]. Une troisième phase de décroissance qui reflète la virémie résiduelle comporte une première partie avec des cellules infectées à demi-vie longue (>9 semaines) suivi d'une quatrième phase où il n'y a pas ou peu de déclin de la charge virale qui se stabilise autour de 1 à 5 copies/ml (médiane à 3 copies/ml) avec des cellules à demi-vie extrêmement longue (plusieurs années).

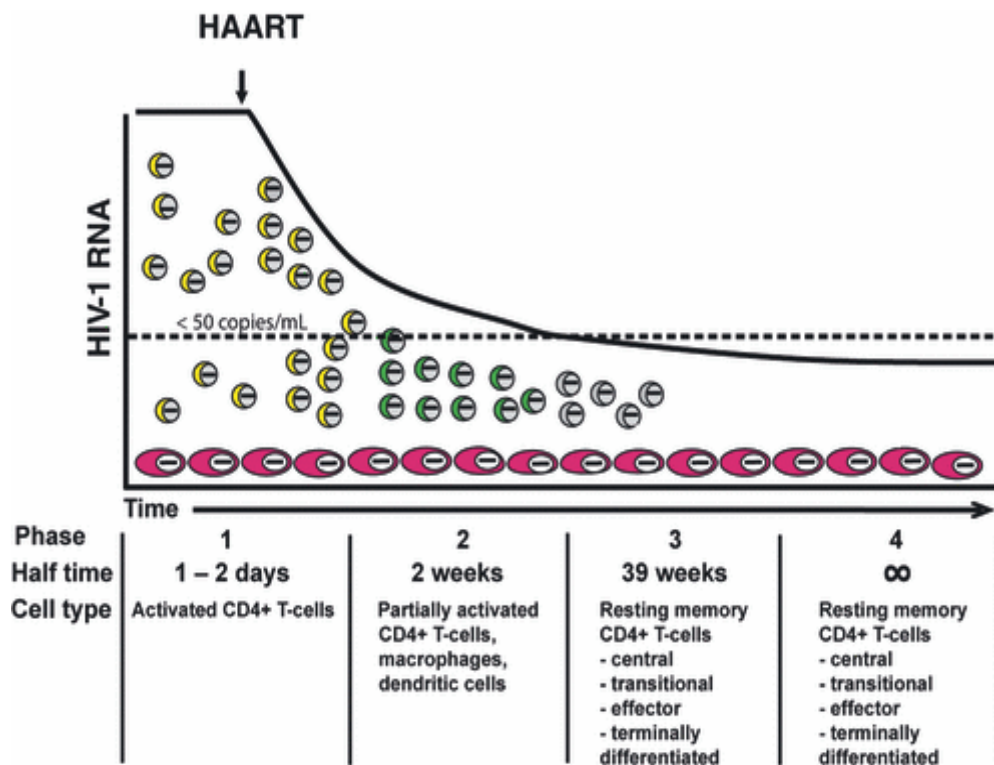


Figure 21. Modélisation des phases de la décroissance de la virémie plasmatique sous traitement. Adaptée de Palmer *et al.* 2011.

### b) Cinétique de décroissance du réservoir

Nous venons donc de voir qu'un traitement antirétroviral optimal permet d'abaisser l'ARN-VIH plasmatique au-dessous du seuil de détection des techniques commerciales. En parallèle une diminution du réservoir sanguin par la mesure de l'ADN-VIH sanguin est observée. Cette diminution dépend du stade de l'infection à l'introduction du traitement antirétroviral. En effet, si le traitement est initié en primo-infection, le niveau d'ADN-VIH moyen au cours du suivi sera inférieur au niveau obtenu si le traitement a été initié en infection chronique (Figure 22) [Hocqueloux *et al.* 2013 ; Avettand-Fenoel *et al.* 2016]. Il a même été observé, en

comparant différents groupes de personnes initiant un traitement en primo-infection réparties en fonction de la date de contamination (infection depuis 0,5 mois, 1 mois, 1,5 mois et 2 mois), que plus le traitement est précoce, plus les niveaux d'ADN-VIH atteints sous traitement sont durablement bas [Laanani *et al.* 2015].

Ainsi, les résultats des études randomisées récentes plaident clairement en faveur du bénéfice immunovirologique d'un traitement initié en primo-infection. Néanmoins, ce bénéfice obtenu sous traitement n'est pas maintenu en cas d'arrêt thérapeutique, ce qui constitue un argument pour poursuivre le traitement à distance de la primo-infection [Walker *et al.* 2013 ; Filder *et al.* 2013].

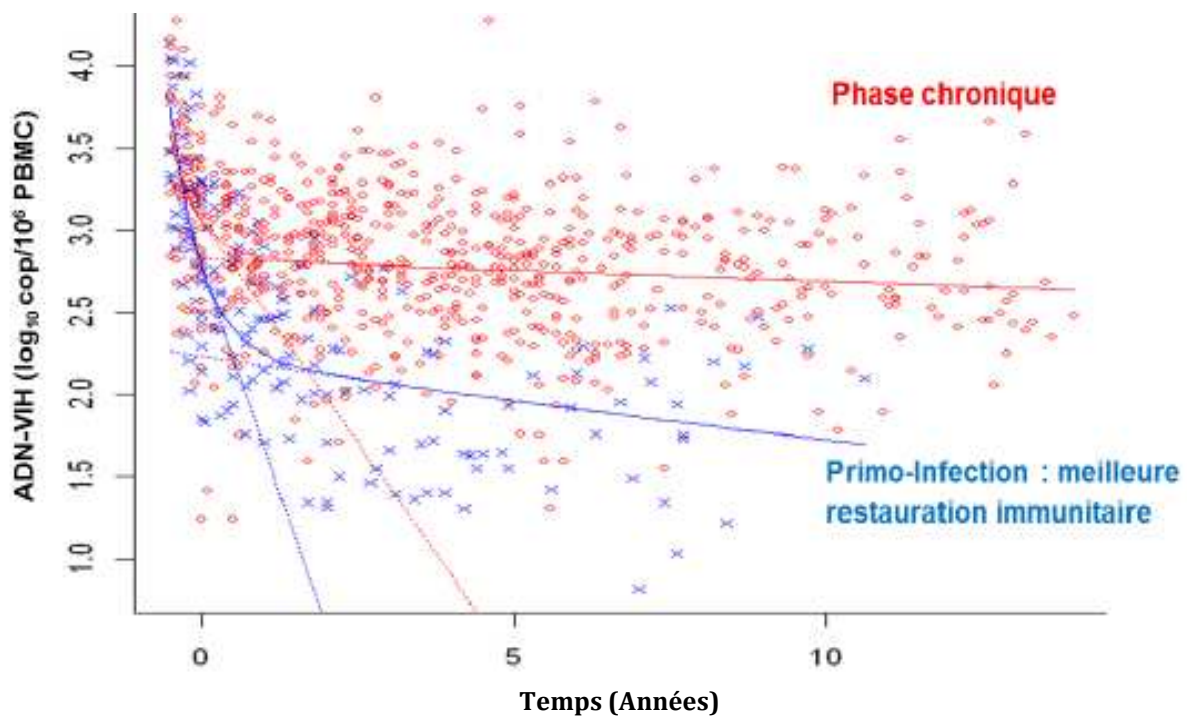


Figure 22. Dynamique de l'ADN-VIH à la mise sous traitement antirétroviral. Adaptée de Hocqueloux *et al.* 2013.

Les niveaux d'ADN-VIH sont plus bas de façon significative dès 18 mois de traitement quand celui-ci a été initié en primo-infection par comparaison à l'infection chronique.

Ainsi, si le niveau de réservoir est un bon indicateur d'efficacité thérapeutique, il n'a pas la même valeur sur le plan quantitatif et sur le plan qualitatif chez les patients en primo-infection et chez les patients chroniques traités. La demi-vie du réservoir des patients traités en primo-

infection est très probablement plus courte que chez des patients traités en phase chronique chez qui les cellules quiescentes à demi-vie plus longue sont infectées. Ces éléments expliquent l'impact plus important des traitements initiés en primo-infection sur la décroissance de l'ADN-VIH [Hocqueloux *et al.* 2013]. Dans cette étude, la cinétique était biphasique. De plus, ce bénéfice sur le réservoir était associé à une meilleure restauration immunitaire chez les patients avec un nombre de T CD4+ > 500/mm<sup>3</sup> et un bon ratio CD4/CD8 au moment de l'initiation du traitement en primo-infection.

La décroissance en dernière phase du réservoir est lente et se poursuit sous traitement durant plusieurs années [Finzi *et al.* 1999]. Cette dernière étude a observé une demi-vie du réservoir d'approximativement 4 ans (Figure 23). En calculant le temps nécessaire de traitement jusqu'à l'éradication du réservoir, cette équipe a montré qu'il faudrait traiter les personnes vivant avec le VIH pendant plus de 70 ans pour atteindre la guérison.

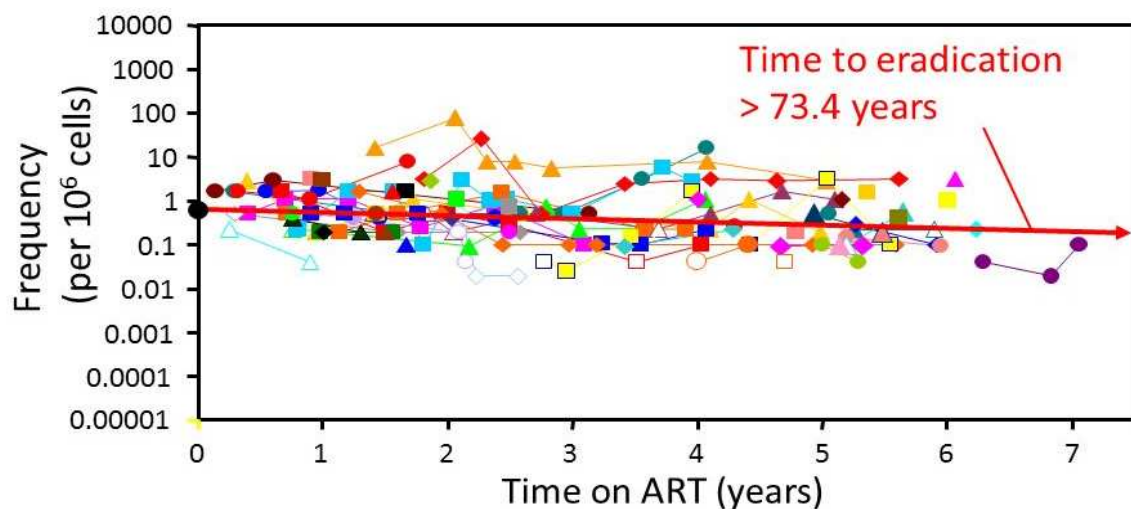


Figure 23. Dynamique du réservoir sous traitement antirétroviral. Adaptée de Finzi *et al.* 1999.

La décroissance est très lente, avec une demi-vie calculée du réservoir sanguin à 3,6 années.

Plusieurs études ont analysé l'impact du traitement sur la décroissance du réservoir viral :

- des études d'intensification qui correspondent à l'ajout d'un ou plusieurs antirétroviraux supplémentaires à une trithérapie standard ;

- des études de switch, c'est-à-dire de remplacement d'une trithérapie par une autre en changeant au moins le troisième agent (issu de la même classe pharmacologique ou non).

La plupart de ces études se sont focalisées sur la classe des II, et plus particulièrement le raltegravir (RAL) qui est la molécule la plus ancienne de cette classe. Les études réalisées sur le RAL, suggèrent que les II pourraient impacter le réservoir viral et l'activation immunitaire généralisée chez les personnes vivant avec le VIH. D'un point de vue physiopathologique, les inhibiteurs d'intégrase comme le RAL empêchent l'intégration de l'ADN viral dans l'ADN humain. Ceci diminue la mort des CD4, induite lors de l'intégration via un signal médié par des protéines-kinases [Cooper *et al.*, 2013]. Les combinaisons incluant du RAL ont donc potentiellement un intérêt dans la réduction du réservoir viral. L'utilisation du RAL en association avec des INTI chez des participants naïfs de traitement antirétroviral en infection chronique a montré une réduction significative du réservoir viral par une baisse de l'ADN proviral (10131 VS 2488 copies par million de cellules,  $p=0,003$ ) et de l'ADN 2-LTR (1600 VS 538 copies par million de cellules,  $p=0,008$ ) à 52 semaines [Koelsch *et al.*, 2011]. Une étude d'intensification par RAL chez des personnes en succès thérapeutique a également montré une réduction significative ( $p=0,021$ ) du nombre de CD4 infectés latents après 48 semaines de traitement [Vallejo *et al.*, 2012]. Une autre étude d'intensification a, quant à elle, démontré une augmentation transitoire de la forme épisomale de l'ADN-VIH suite à la mise sous RAL, témoignant d'un échec d'intégration [Buzon *et al.* 2010]. Ce résultat était en faveur d'un effet sur le réservoir capable de réplique active. Ces précédents résultats restent cependant controversés car deux études d'évaluation du réservoir viral ont été réalisées en switch vers des combinaisons incluant du RAL chez des patients en charge virale indétectable et n'ont pas montré de changement des niveaux d'ADN-VIH et des cercles 2-LTR [Delaugerre *et al.*, 2010 ; Lam *et al.*, 2012]. Des études supplémentaires, notamment celles incluant le nouvel inhibiteur d'intégrase, DTG, sont nécessaires pour déterminer l'efficacité de cette classe sur le réservoir viral.

### c) *Sous-populations cellulaires infectées*

Sous traitement, Chomont *et al.* ont mis en évidence chez 45 patients traités en phase chronique de l'infection avec une charge virale indétectable au moment de l'analyse, que les fréquences d'infection des sous-populations lymphocytaires : TN, TCM, TTM et TEM étaient

équivalentes avec une contribution dominante pour les TCM (Figure 24) qui assure la persistance du réservoir par prolifération homéostatique [Chomont *et al.* 2009].

Si le traitement est initié en primo-infection, comme dans l'étude OPTIPRIM, les fréquences d'infection des différentes sous-populations lymphocytaires T CD4+ sont différentes. En effet, nous avons vu qu'en primo-infection, la sous-population qui contribue le plus au pool de lymphocytes T CD4+ infectés est les TTM [Chéret *et al.* 2015]. Dans cette étude randomisée, les personnes se sont vues proposer soit une trithérapie standard, soit un traitement intensifié (une pentathérapie). L'objectif principal de l'essai OPTIPRIM était d'évaluer l'effet de ce traitement intensifié sur la quantité de réservoir. Bien qu'aucune différence n'ait été objectivée sur le critère de jugement principal, l'équipe a montré qu'après 24 mois de traitement les TTM contribuaient toujours en majorité au pool de cellules infectées (Figure 24) [Chéret *et al.* 2015].

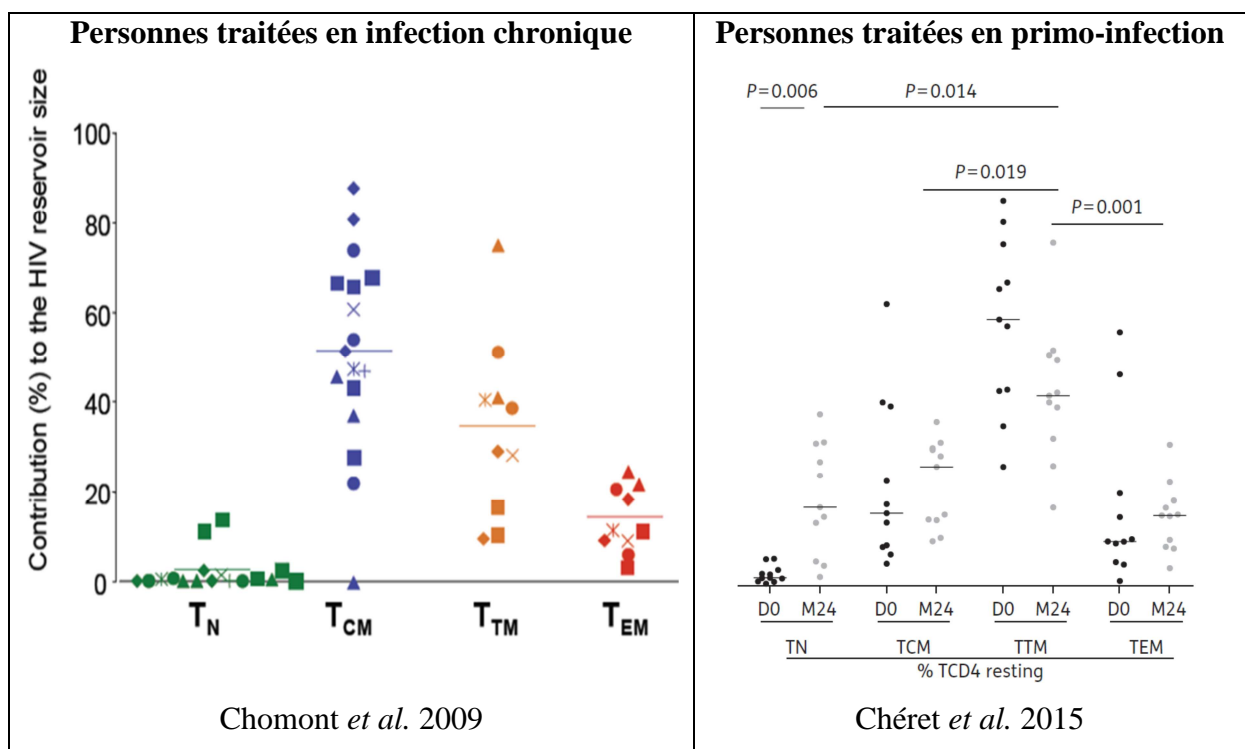


Figure 24. Réservoir dans les sous-populations lymphocytaires T CD4+ sous traitement antirétroviral. Adaptée de Chomont *et al.* 2009 et Chéret *et al.* 2015.

#### d) Diversité virale sous traitement

La charge virale étant indétectable sous traitement efficace, deux hypothèses sur la dynamique de la diversité génétique dans le réservoir ADN-VIH sont possibles :

- soit il existe une réplication résiduelle (c'est-à-dire en-dessous du seuil des techniques de mesure de l'ARN-VIH) faible mais réelle et donc suffisante pour générer de nouveaux variants et donc de la diversité génétique. La réplication résiduelle pourrait notamment être possible et ponctuelle dans différents compartiments réservoirs du virus, ceci en raison d'une pénétration insuffisante pour stopper complètement la réplication virale des molécules antirétrovirales dans ces différents sanctuaires anatomiques. La génération de nouveaux variants dans différents compartiments pourrait également être complétée par l'homéostasie cellulaire, permettant de faire circuler les cellules infectées avec ces nouveaux variants dans les autres compartiments (modèle de la métapopulation). Du point de vue technique, le séquençage des variants archivés a largement été utilisé pour répondre à cette hypothèse. Ainsi, les variants archivés devraient être différents entre les différents temps passés sous traitement antirétroviral, et une analyse des sites d'intégration des différents provirus devrait l'être également ;
- soit il n'y a pas de réplication résiduelle et donc pas de nouvelle diversité génétique dans aucun des compartiments réservoirs. Auquel cas, la présence continue des cellules infectées serait objective par la longue demi-vie de celles-ci, et leur expansion clonale. Par des techniques de séquençage, on s'attend cette fois-ci à observer les mêmes variants intégrés au cours du temps, et les mêmes sites d'intégration en lien avec la clonalité.

Malgré plusieurs études, la variabilité génétique des souches archivées ainsi que l'existence d'une réplication résiduelle restent controversées.

Des études récentes ont suggéré que, chez certaines personnes, le réservoir viral est génétiquement stable et est maintenu par l'expansion clonale de cellules infectées à l'état de latence. [Lee *et al.* 2017 ; van Zyl *et al.* 2016 ; Cohn *et al.* 2015 ; Chéret *et al.* 2015 ; von Stockenstrom *et al.* 2015 ; Josefsson *et al.* 2013]. Certaines de ces études se sont focalisées sur des personnes traitées en primo-infection [van Zyl *et al.* 2016 ; Chéret *et al.* 2015] et leurs résultats ne peuvent donc probablement pas être extrapolés aux autres personnes. D'autres ont comparé l'évolution des variants archivés au cours du temps alors que les personnes étaient déjà sous traitement [Stockenstrom *et al.* 2015 ; Josefsson *et al.* 2013], ce qui ne permet pas

d'analyser la dynamique précoce du réservoir à la mise sous traitement.

D'autres équipes ont démontré l'existence de réplication résiduelle ou l'existence d'une réplication cryptique dans les compartiments réservoirs sous traitement antirétroviral [Lorenzo-Redondo *et al.* 2016, Gantner *et al.* 2016 ; Palmer *et al.* 2008]. La technique de séquençage utilisée étant différente de celles des premières études, on peut émettre l'hypothèse de la technique expliquant les différences de résultats.

#### e) *Qualité des séquences virales archivées*

Pour évaluer la qualité du génome viral, c'est-à-dire quantifier le nombre de virus défectifs, il est nécessaire de séquencer l'intégralité du provirus. Deux grandes études récentes ont analysé en séquençage à haut débit le génome ADN-VIH complet de personnes traitées [Lee *et al.* 2017 ; Bruner *et al.* 2016].

Bruner *et al.* ont démontré que la plupart des provirus sont défectifs chez des personnes traitées en infection chronique et en primo-infection [Bruner *et al.* 2016]. Après dilution des lymphocytes T CD4+ quiescents, la quasi-totalité du génome du VIH a été séquencé pour chaque cellule. Ainsi, pour les personnes traitées en primo-infection, seulement 7% des provirus séquencés étaient intacts. On peut également noter que 58% des provirus possédaient des délétions, 16% étaient hypermutés et 15% étaient délétés et hypermutés. Pour les personnes traitées en infection chronique, seulement 2% des provirus séquencés étaient intacts. Pour ce groupe, on note 80% des provirus avec des délétions, 7% avec hypermutation et 8% avec délétion et hypermutation.

Lee *et al.* ont démontré que la plupart des provirus sont défectifs chez des personnes traitées en infection chronique et en primo-infection [Lee *et al.* 2017]. Après isolement des lymphocytes T CD4+ mémoires, la quasi-totalité du génome du VIH a été séquencé. Pour les personnes traitées en infection chronique, seulement 4% des provirus séquencés étaient intacts (Figure 24). Dans cette étude, une analyse plus fine de la répartition de ces provirus intacts a été réalisée. Les lymphocytes T CD4+ mémoires ont été triés selon leur polarisation fonctionnelle par cytométrie en flux. Plusieurs sous populations identiques ont été retrouvées dans chaque sous-type de cellules, ce qui est en faveur avec leur expansion clonale. Parmi les séquences intactes, 62% semblaient être issues de ce mécanisme d'expansion. Enfin, la sous-famille de cellules qui était porteuse du plus grand nombre de provirus intacts était les lymphocytes T CD4+ polarisés Th1 (Figure 25).



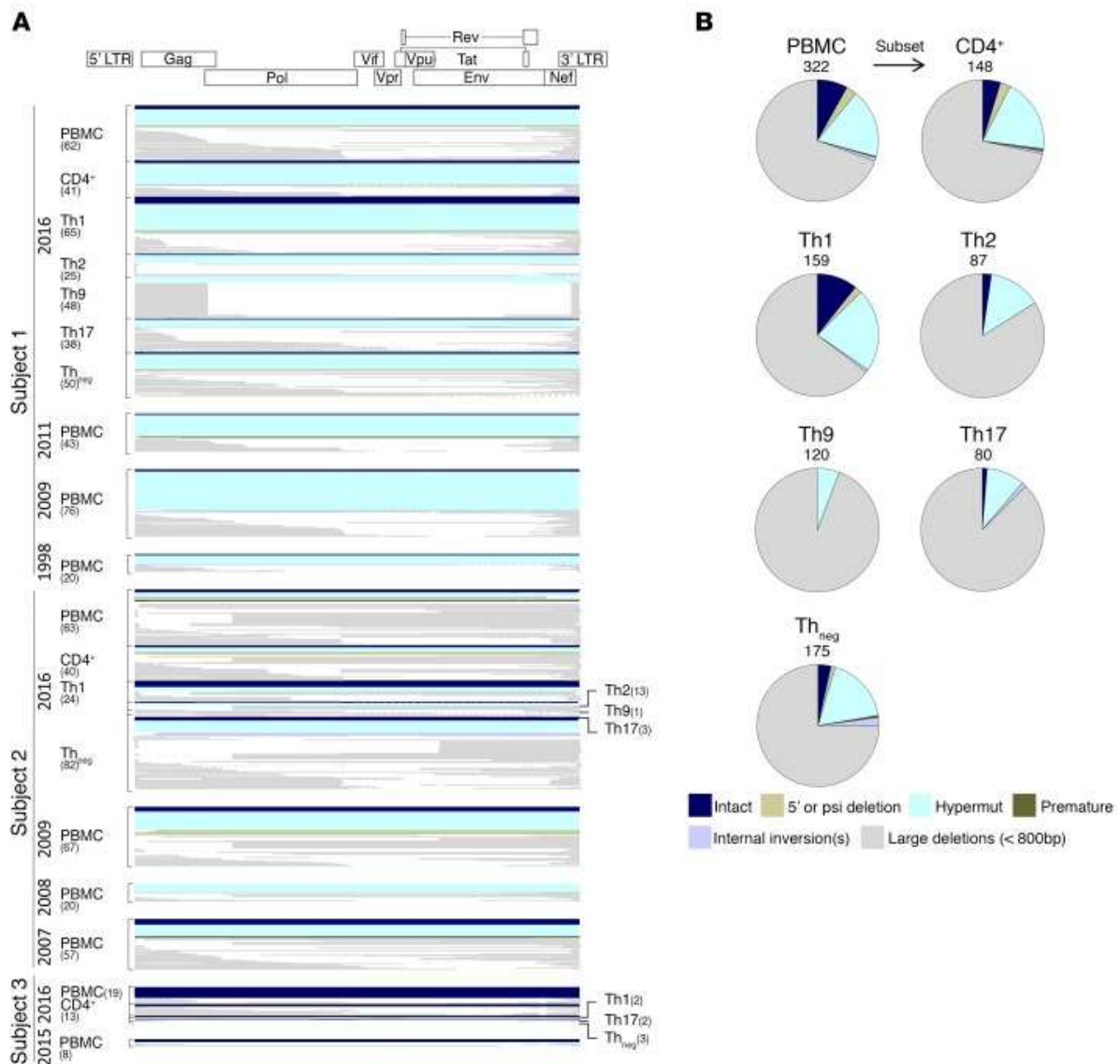


Figure 25. Réservoir dans les lymphocytaires T CD4<sup>+</sup> polarisés sous traitement antirétroviral. Adaptée de Lee et al. 2017.

Les différents provirus séquencés sont représentés par individu et population cellulaire, à savoir : les séquences délétées (grises), hypermutées (cyan) et intactes (marine) sont représentées en alignement par rapport au génome du VIH-1 (A) ou par la proportion de la quasiespèce pour le participant 1 (B).

## 2. Le tractus génital masculin

L'initiation d'un traitement antirétroviral a montré une diminution importante mais pas obligatoirement concomitante de l'ARN-VIH dans le sang et le sperme [Sheth et al. 2009], la

penne de diminution semblant dépendre de la combinaison antirétrovirale utilisée [Gutierrez-Valencia *et al.* 2017]. Bien qu'un traitement antirétroviral efficace rende indétectable la charge virale dans le sang et le sperme, et limite ainsi le risque résiduel de transmission du virus [Mujugira *et al.* 2016], plusieurs équipes ont rapporté une dissociation entre les charges virales des deux compartiments dans une certaine mesure [Kalichman *et al.* 2008]. Bien que la plupart de ces études fussent transversales, quelques études longitudinales ont montré que la détection du VIH dans le plasma séminal était intermittente (Figure 11). Cette détection intermittente est retrouvée chez 5 à 8% des hommes sous traitement en succès virologique depuis longtemps [Ghosn *et al.* 2014]. Cette détection du VIH dans le sperme d'individus traités a été corrélée à un niveau élevé d'ADN-VIH dans les CMSP et les cellules rondes du sperme, mais également à des facteurs inflammatoires comme la sécrétion concomitante de CMV dans le sperme. [Ghosn *et al.* 2014 ; Gantner *et al.* 2016 ; Gianella *et al.* 2014]. D'un côté, la réplication du CMV dans le tractus génital peut favoriser une expression de l'ARN-VIH, d'un autre côté la présence d'ADN-VIH dans les cellules du sperme sera plus vraisemblablement à l'origine d'une réplication locale. Ainsi, certains variants viraux détectés dans le sperme d'individus sous traitement pourraient provenir de la réplication locale. De plus, les infections sexuellement transmissibles et l'inflammation génitale sont associées à une détection accrue du virus dans le sperme et peuvent partiellement supprimer l'effet protecteur du traitement chez les individus sexuellement actifs [Sadiq *et al.* 2012]. Chez les individus présentant une urétrite symptomatique, la charge virale séminale a pu être diminuée après traitement antibiotique [Sadiq *et al.* 2012].

### **3. Le tractus génital féminin**

L'initiation d'un traitement antirétroviral entraîne également la réduction d'ARN-VIH dans le sang et les sécrétions cervicovaginales [Cu-Uvin *et al.* 2006]. Cependant, une réplication active du virus dans le tractus génital féminin a été rapportée chez des femmes traitées en charge virale plasmatique indétectable, particulièrement dans un contexte d'inflammation locale (Figure 12). En effet, après au moins un an de traitement efficace, l'ARN-VIH ou l'ADN-VIH peut être détecté chez 5 à 40% des femmes [Kovacs *et al.* 2001 ; Launay *et al.* 2011 ; King *et al.* 2017]. Les prédictors de la détection du VIH dans les sécrétions cervicovaginales sont le stade clinique de l'infection à VIH, le type de traitement antirétroviral et des douleurs ou ulcères génitaux [King *et al.* 2017].

#### 4. Le tractus digestif

Un traitement antirétroviral efficace permet également de réduire la charge virale ARN dans le rectum, mais ce dernier est néanmoins encore détectable [Kelley *et al.* 2011 ; Kiviat *et al.* 1998]. L'activation immunitaire est également persistante dans ce compartiment, en raison de la stimulation permanente par les antigènes viraux malgré un traitement antirétroviral efficace à long terme [Rueda *et al.* ; 2012].

La recherche d'une compartimentalisation du virus sous traitement efficace a donc été investiguée et plusieurs équipes ont travaillé sur ce sujet. ARN et ADN-VIH ont été retrouvés en quantité plus importante que dans les CMSP, mais leur distribution varie le long du tractus digestif. Par exemple, l'ARN-VIH non épissé était respectivement 10,2 et 2,4 fois supérieur par rapport au sang sous traitement antirétroviral [Chun *et al.* 2005]. De plus, un ratio ARN/ADN-VIH à 4,6 dans le GALT suggère l'existence d'une réplication résiduelle dans ce compartiment [Yukl *et al.* 2010]. D'autres études ont confirmé une moyenne d'augmentation du niveau d'ADN-VIH dans la GALT par rapport au sang d'environ 5 fois malgré le traitement antirétroviral [Chun *et al.* 2008].

Par ailleurs, une autre analyse isolant l'ADN-VIH du colon, de l'iléum et des CMSP n'a pas montré de compartimentalisation chez des personnes traitées en charge virale sanguine indétectable [Imamichi *et al.* 2011]. Enfin, dans une dernière étude, les séquences du gène *env* n'étaient pas différentes entre les CMSP et le GALT, chez des personnes ayant initié un traitement en primo-infection [Evering *et al.* 2012].

La contribution majoritaire au pool de cellules CD4+ n'est pas la même entre le sang et le GALT, en effet, il a été montré que les TEM sont la sous-population lymphocytaire la plus contributrice dans ce compartiment [Yukl *et al.* 2013].

**En résumé,** sous traitement antirétroviral efficace :

- L'ARN et l'ADN-VIH dans le sang diminuent sous traitement [Avettand-Fenoel *et al.* 2016]
- La plupart des virus intégrés sont défectifs [Lee *et al.* 2017]
- L'évolution de la diversité génétique des provirus sanguins est controversée [van Zyl *et al.* 2017 ; Lorenzo-Redondo *et al.* 2016]
- Les TCM ou les TTM contribuent en majorité au réservoir si le traitement a été instauré en infection chronique ou en primo-infection, respectivement [Chomont *et al.* 2009 ; Chéret *et al.* 2015]
- L'ARN et l'ADN-VIH sont présents de façon intermittente dans le sperme et les sécrétions cervicovaginales de quelques personnes, en faveur d'une possible compartimentalisation [Ghosn *et al.* 2014 ; King *et al.* 2017]
- L'ARN et l'ADN-VIH sont présents en plus grande quantité dans le tissu digestif que dans le sang, mais il ne semble pas y avoir de compartimentalisation [Chun *et al.* 2008, Imamichi *et al.* 2011]

## IV. Échec virologique

Comme nous venons de le voir un traitement antirétroviral efficace permet d'obtenir et de maintenir une charge virale ARN VIH-1 plasmatique en-dessous du seuil de mesure des techniques actuellement utilisées. Cependant, dans certaines situations ce traitement peut ne pas être efficace. Une perte ou une non-efficacité d'un traitement antirétroviral est principalement reliée à une concentration insuffisante du médicament dans l'organisme. Le virus va donc être capable de se répliquer en présence d'une faible quantité du médicament et la variabilité génétique de celui-ci va permettre la sélection et l'émergence de résistances au traitement en cours.

Ces situations d'échec virologique vont nécessiter d'adapter la prise en charge de la personne, ce que nous allons voir par la suite, ainsi que l'impact de ces situations de rebond virologique sur le réservoir.

### A. Définitions

Dans la plupart des essais cliniques évaluant les nouvelles combinaisons thérapeutiques, un échec virologique chez une personne traitée depuis plus de 6 mois est défini par :

- un ARN-VIH  $> 50$  copies/mL sur deux mesures consécutives à environ 1 mois d'intervalle ;
- un ARN-VIH  $> 1000$  copies/mL sur une seule mesure.

On parle d'interruption thérapeutique chez les personnes arrêtant leur traitement complètement du jour au lendemain. Les causes d'arrêt complet peuvent être par décision du patient ou programmé dans le cadre d'essais thérapeutiques (principalement pour l'étude de stratégies de guérison).

Les **causes d'échec virologique** sont plus complexes et peuvent être de différentes natures, mais n'ont pas la même fréquence en clinique :

- la puissance du traitement antirétroviral peut être insuffisante pour supprimer la répllication virale sanguine et/ou dans les autres compartiments. Cela a par exemple été montré avec les essais sur les bithérapies ou les monothérapies : certaines

combinaisons antirétrovirales sont insuffisantes pour juguler la réplication virale, et on assiste alors à un rebond virologique [Katlama *et al.* 2014] ;

- le virus peut être résistant à une ou plusieurs des molécules antirétrovirales utilisées. Dans ce cas il peut s'agir soit d'une résistance primaire (la souche transmise au moment de la contamination est résistante) ou secondaire (la résistance a été acquise sous traitement de l'individu). Les variants résistants sont alors capables de se répliquer en présence du traitement [Coffin *et al.* 1995] ;
- la concentration du traitement peut être insuffisante dans l'organisme. Elle s'explique soit par un défaut d'observance au traitement (nombreux oublis de prises), soit par une interaction médicamenteuse (comme par exemple les inhibiteurs de la pompe à proton qui empêchent l'absorption de la rilpivirine).

Dans les deux premiers cas, la prise en charge est de modifier la combinaison thérapeutique pour avoir au moins trois molécules pleinement actives, et ainsi espérer un contrôle de la charge virale plasmatique. Dans le second cas, les interactions sont gérées par une adaptation pharmacologique et les causes de l'inobservance investiguées pour une prise en charge adaptée.

Parmi les causes d'échec virologique, on le verra par la suite, figure **la résistance**. La résistance correspond à une diminution de sensibilité des variants viraux aux traitements antirétroviraux. Le profil de résistance est spécifique à chaque molécule antirétrovirale et correspond à une ou plusieurs mutations du gène codant pour la protéine virale ciblée. Les mécanismes de résistance des différentes classes pharmacologiques d'antirétroviraux ne seront pas détaillés ici, exception faite pour la classe des II actuellement commercialisées et qui ciblent la réaction catalytique de l'enzyme, sujet du présent travail. Pour rappel, ces molécules ciblent le complexe ADN-VIH/intégrase.

Les mécanismes de résistance du VIH aux II actuels sont multiples mais impliquent tous une diminution de la liaison de l'II au site actif de l'enzyme [Anstett *et al.* 2017 ; Thierry *et al.* 2017], et il existe notamment plusieurs voies de résistance (Figure 26) :

- la voie Q148/G140 (RAL, EVG) ;
- la voie N155/E92 (RAL, EVG, DTG) ;
- la voie Y143 (RAL) ;
- la voie T66 (EVG, RAL) ;
- la voie E92 (EVG, RAL) ;

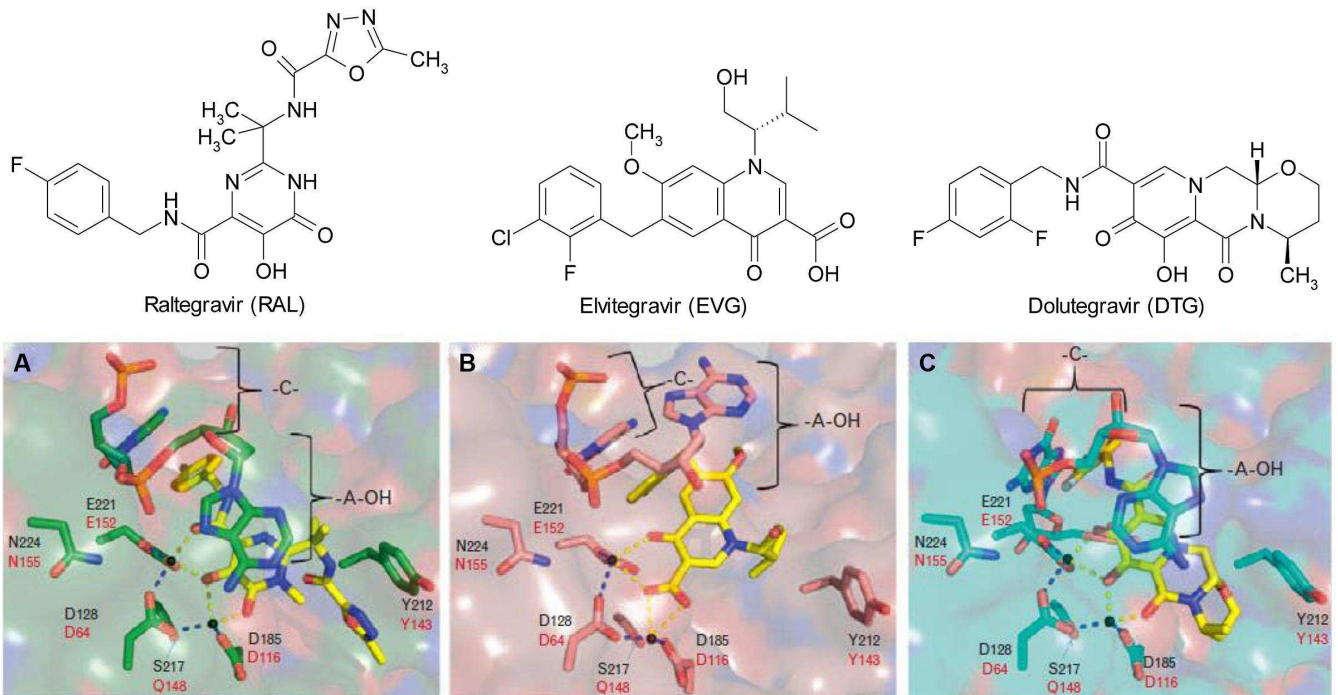
- la mutation R263K (DTG) ;

À cela viennent s'ajouter :

- des mutations polymorphiques (par exemple S119R) qui n'affectent pas seules la sensibilité aux II, mais potentialisent la résistance en association avec les autres voies ;
- des mutations secondaires à effet compensatoires qui restaurent la capacité répliquative de la souche, comme la G140S en association avec la Q148H ou la E92Q en association avec la Y143R/C ou N155H.

Récemment, des mutations à l'extrémité 3' PPT du VIH, soit en-dehors du gène de l'intégrase, ont été associées à une résistance au DTG [Malet *et al.* 2017].

Figure 26. Structure chimique des II, sites de liaisons à l'intégrase et voies de



résistance. Adaptée de Wainberg *et al.* 2015.

Les différents provirus séquencés sont représentés par individu et population cellulaire, à savoir : les séquences délétées (grises), hypermutées (cyan) et intactes (marine) sont représentées en alignement par rapport au génome du virus

## ***B. Échec virologique & résistance***

### **1. Problématique de l'archivage des mutations de résistance**

Les échecs virologiques favorisent la sélection de variants VIH-1 porteurs de mutations de résistance aux antirétroviraux en cours. Les quasiespèces virales ainsi sélectionnées comportent des mutations dans les gènes codant pour les enzymes ou pour les protéines cibles des antirétroviraux : la transcriptase inverse, la protéase, la gp120, la gp41 ou l'intégrase du VIH. Cette sélection de mutations de résistance va également dépendre de facteurs pharmacologiques (concentrations plasmatiques suboptimales d'antirétroviraux consécutives à des difficultés d'adhésion ou à des interactions médicamenteuses), de la puissance de la combinaison choisie (d'où la nécessité de prescrire une association de trois molécules dans la plupart des cas) et de la barrière génétique du virus vis-à-vis des différents antirétroviraux, c'est-à-dire du nombre et de la rapidité d'acquisition de mutations virales qui permettent au virus d'être résistant.

Chaque cycle répliatif du VIH conduit à l'introduction par la transcriptase inverse de simples erreurs dans la transcription du génome viral, au rythme d'une erreur environ pour chaque génome répliqué [Preston *et al.*, 1988]. Ainsi, si l'on considère le nombre très élevé d'évènements de réplication par le VIH au cours de l'infection *in vivo*, la réplication virale semble capable de générer chaque jour plusieurs millions de copies de génomes viraux porteurs chacun d'au moins une des mutations possibles au sein du génome. Dès lors, si ces mutations donnent au virus la capacité d'échapper, même très partiellement, à l'action d'une molécule antirétrovirale, ce mutant résistant sera automatiquement sélectionné et prendra le dessus sur tous les autres variants viraux [Coffin *et al.* 1995].

Dans le contexte d'interruptions thérapeutiques programmées, il n'y a en général pas d'émergence de résistance [Clarridge *et al.* 2018].

Par ailleurs, le cycle répliatif du VIH comprend une étape d'intégration de l'ARN-VIH rétrotranscrit en ADN-VIH dans le génome des cellules cibles sous forme de provirus. Cette intégration est à l'origine de la persistance de l'infection par le VIH-1. La diversité des types cellulaires et leur localisation anatomique variée créent autant de sanctuaires pouvant abriter



le VIH-1. Les variants résistants circulant dans le plasma lors des échecs virologiques vont donc également pouvoir s'intégrer dans les cellules qui composent le réservoir viral. Les mutations de résistance aux antirétroviraux sont alors archivées sous forme d'ADN-VIH intégré dans le génome cellulaire des lymphocytes T CD4+, notamment des cellules mémoires qui persistent au long cours dans l'organisme en raison de leur longue demi-vie et de leur grande capacité proliférative. Les cellules réservoirs, notamment les lymphocytes, circulent dans l'organisme grâce au sang et aux organes lymphoïdes. Cette dynamique spatiale du réservoir dans l'organisme liée à la réplication virale et à l'homéostasie lymphocytaire et temporelle permet la dissémination des résistances [Turriziani *et al.* 2010].

Du point de vue physiopathologique, les variants VIH résistants circulant dans le plasma lors de l'échec virologique portent des mutations dans les gènes conférant une sensibilité diminuée au traitement et un avantage répliatif temporaire (mais pas toujours) en présence d'antirétroviraux par rapport aux souches sauvages, sensibles aux antirétroviraux [Pinggen *et al.* 2011]. Au cours des échecs thérapeutiques successifs, les mutations sélectionnées sous pression médicamenteuse, peuvent générer une résistance croisée à de nombreuses molécules, réduisant ainsi les options thérapeutiques efficaces chez les patients [Boender *et al.* 2016]. Les virions résistants peuvent être détectés dans le plasma sous pression d'antirétroviraux. Lorsque cette pression est suspendue, le variant sauvage domine à nouveau la quasiespèce virale plasmatique car il a une meilleure capacité répliative et les mutations de résistance ne sont plus détectées par les techniques classiques de génotypage dans l'ARN des virions [Paquet *et al.* 2011].

A la réintroduction des mêmes antirétroviraux, des virions portant les mutations de résistance acquises lors de l'échec virologique peuvent émerger à nouveau et conduire à un nouvel échec virologique [Ghosn *et al.*, 2005 ; Pellegrin *et al.*, 2003 ; Moorthy *et al.*, 2011] mais les résultats sont controversés [Falasca *et al.*, 2013].

Cette réémergence témoigne de **l'archivage et de la persistance des variants résistants** dans les réservoirs. En effet, les variants viraux résistants archivés peuvent avoir persisté au sein de la quasiespèce. Ainsi, les mutations peuvent persister longtemps dans le compartiment cellulaire alors même qu'elles ne sont plus détectées dans le plasma lorsque le traitement est suspendu [Wagner *et al.* 2010]. Au cours de chaque échec thérapeutique, le compartiment

cellulaire s'enrichit progressivement en variants résistants représentant l'archivage des mutations de résistance [Falasca *et al.* 2013 ; Lambotte *et al.* 2004 ; Verhofstede *et al.* 2004]. Les variants résistants archivés, sélectionnés au cours des échecs thérapeutiques antérieurs, peuvent donc avoir des **conséquences cliniques** importantes chez les patients.

La **durée de persistance** des variants résistants archivés dépend principalement de la demi-vie des cellules, qui est très variable selon leur niveau de différenciation et d'activation, et de leur prolifération homéostatique [Verhofstede *et al.* 2004]. Dans le cas d'une infection d'emblée par des virus résistants (résistance primaire), il a été démontré que la constitution du réservoir viral était dominée par des virus résistants pouvant persister pendant plusieurs années et ce, même en l'absence de pression de sélection [Delaugerre *et al.* 2004 ; Ghosn *et al.* 2006 ; Ghosn *et al.* 2011 ; Gantner *et al.* 2016].

Peu de données sont disponibles sur la durée de persistance de ces mutations et leurs conséquences en cas d'allègement ou de changement de traitement chez des patients contrôlés par un traitement efficace mais ayant eu des antécédents d'échecs virologiques. Or, il est souvent nécessaire d'adapter le traitement au cours du temps, par exemple en raison de toxicités et d'interactions médicamenteuses. À l'heure actuelle, en l'absence de données, l'adaptation du traitement antirétroviral doit tenir compte de l'ensemble des résistances du VIH à certaines molécules ou classes pharmacologiques identifiées au cours des échecs virologiques successifs. La règle est donc de ne pas réintroduire une molécule antirétrovirale pour laquelle une résistance a été identifiée sur les géotypes cumulés sur l'ARN-VIH, y compris si elle n'est plus détectée sur l'ARN-VIH, en raison de la persistance de cellules réservoirs avec un génome viral intégré porteur de ces mutations. L'existence de résistances croisées au sein d'une même classe pharmacologique rend souvent difficile l'utilisation de nouvelles molécules d'une classe pour laquelle un échec thérapeutique a été identifié dans le passé.

## 2. Détection des résistances du VIH

Depuis plusieurs années, les tests de résistance génotypique par **séquençage classique** (séquençage Sanger) sont recommandés en routine dans la prise en charge des personnes vivant avec le VIH-1 [Morlat, 2017. Rapport sur la prise en charge des personnes vivant avec

le VIH]. Une limite majeure de cette méthode de séquençage réside dans la non-détection des **variants résistants minoritaires** (variants de la quasiespèce VIH-1 portant des mutations de résistances et représentant moins de 20-25% de la population virale) [Schuurman *et al.* 1999]. Ces variants minoritaires sont fréquemment retrouvés durant l'infection par le VIH-1 et sont générés lors d'erreurs durant la réplication du virus (résistances acquises) et/ou transmises directement par la personne source porteuse de variants résistants (résistances primaires) [Gianella *et al.*, 2010]. Les variants minoritaires résistants peuvent donc être retrouvés chez des patients naïfs ou prétraités, et des résistances ont été identifiées pour toutes les classes pharmacologiques [Li *et al.* 2013].

Différentes méthodes permettant la **détection de variants minoritaires** ont été décrites : PCR spécifique d'allèle muté, séquençage de multiples clones moléculaires après dilution limite (*single genome sequencing*), séquençage ultrasensible par des techniques de nouvelle génération à haut débit, notamment le pyroséquençage (*ultradeep sequencing* : UDS). L'approche par PCR quantitative utilisant des oligonucléotides discriminant les mutations permet de détecter des variants de moins de 1% [Halvas *et al.*, 2006 ; Metzner *et al.*, 2003 ; Metzner *et al.*, 2010 ; Paredes *et al.*, 2007]. Cependant, cette dernière approche est limitée à un nombre défini de mutations de résistance et n'apporte donc pas suffisamment d'information pour une interprétation complète du profil de résistance. De plus, la découverte de nouvelles mutations nécessite la mise à jour régulière du test. Les méthodes de séquençage à haut débit permettent d'atteindre une sensibilité de 0,1 à 1 % pour la détection des variants minoritaires [Lee *et al.* 2017 ; Li *et al.* 2013 ; Charpentier *et al.* 2015 ; Raymond *et al.* 2014 ; Sede *et al.* 2014].

Le **séquençage à haut débit**, ou UDS, peut détecter et quantifier simultanément les variants minoritaires résistants sur un même gène ou une même portion de gène. L'application de cette technique au VIH a été étudiée en terme de faisabilité et de pertinence clinique sur les gènes de la protéase et de la transcriptase inverse [Simen *et al.* 2009 ; Le *et al.* 2009] et a permis d'analyser le tropisme VIH-1 par la séquence de la boucle V3 du gène *env* codant l'enveloppe virale [Abbate *et al.* 2011 ; Daumer *et al.* 2011]. Les résultats obtenus en UDS semblent reproductibles [Simen *et al.* 2014]. L'UDS constitue l'approche la plus prometteuse mais nécessite l'utilisation de logiciels et de compétences spécifiques pour le traitement bio-informatique des données. Les techniques UDS permettent de différencier la plupart des

variants génétiquement distincts qui coexistent chez un patient donné. Chaque séquence varie de 200 à 1000 nucléotides selon la technique utilisée et correspond à un clone viral. Cela permet de détecter si les mutations retrouvées sont portées par un même clone ou des clones différents. En effet, les mutations associées à la résistance aux antirétroviraux peuvent être portées sur des génomes distincts qui peuvent être alors sensibles à une combinaison de plusieurs antirétroviraux, chacun étant sensible à l'une ou l'autre des molécules. En revanche quand les mutations sont liées sur un même génome, ces variants peuvent devenir résistants à une association incluant les antirétroviraux concernés.

La présence de **variants résistants dans l'ARN-VIH** a été plus fréquemment mise en évidence chez les patients naïfs d'antirétroviraux en utilisant les techniques UDS qu'avec les approches classiques de séquençage de populations qui ne détectent que les populations majoritaires [Metzner *et al.* 2005 ; Avidor *et al.* 2013 ; Fernandez-Caballero *et al.* 2014]. Se pose alors la question de l'impact clinique de la présence ou non de ces variants résistants minoritaires.

Plusieurs études ont montré une relation entre la présence de **variants minoritaires résistants aux INNTI** dans l'ARN VIH-1 et un échec à un traitement comportant ces molécules [Paredes *et al.* 2010 ; Li *et al.* 2011]. L'étude la plus récente étude a montré un odd-ratio à 2,75 ( $p=0,005$ ) d'échec virologique lors de la détection d'au moins un variant minoritaire résistant contre aucune mutation détectée [Cozzi-Lepri *et al.*, 2015]. Un seuil en valeur absolue ou en pourcentage de la quasiespèce doit être défini pour prédire l'impact d'un variant résistant minoritaire sur la réponse à un traitement antirétroviral. Des approches sensibles de détection de la mutation K103N (PCR allèle spécifique et UDS) [Delobel *et al.* 2011] ont été comparées sur des échantillons longitudinaux de patients recevant de l'efavirenz et inclus dans l'essai d'interruption Window-ANRS106. Cette comparaison révèle une très bonne concordance entre les 2 techniques avec une sensibilité meilleure pour la PCR allèle spécifique (0,01%) que pour l' UDS (1,5%) pour les techniques utilisées. Pour les 7 patients avec une fréquence des variants résistants K103N inférieure à 0,1%, ni sélection de résistance ultérieure ni échec virologique n'ont été observés. En revanche, parmi les 8 patients avec une fréquence supérieure à 0,1%, la sélection d'une population dominante mutée K103N a été observée chez 6 patients et l'échec virologique chez 3. Récemment, la détection de variants n'a pas montré d'échec virologique supplémentaire à un traitement de première ligne

comprenant un INNTI [Nicot *et al.* 2015 ; Raymond *et al.* 2017]. Cependant les études disponibles sur la détection des variants minoritaires par les techniques UDS sont encore insuffisantes pour justifier l'utilisation en routine de cette technique eu égard à son coût, au nombre de mutations supplémentaires détectées et à la possibilité de succès virologique malgré la présence de variants minoritaires résistants [Metzner *et al.*, 2014].

De même, il a été montré que la présence de **variants minoritaires de tropisme X4** dans l'ARN-VIH était associée à une augmentation du risque d'échec virologique chez les patients traités par MVC [Baatz *et al.* 2011 ; Archer *et al.* 2011 ; Swenson *et al.*, 2011] ou de changement/sélection de variants majoritaires à tropisme X4 [Lee *et al.* 2014]. La plupart des études sur le tropisme en UDS sont des études transversales, excepté deux études. Dans une première étude, le tropisme a été déterminé en UDS chez 19 patients dans l'ARN-VIH avant et après l'échec virologique [Sede *et al.* 2014]. L'analyse montre que les variants X4 peuvent émerger à différents moments au cours de l'infection, certains variants préexistant depuis le début de l'infection et devenant majoritaires au cours du temps. Une seconde étude a montré auprès de 10 patients contrôlés virologiquement que le tropisme de variants archivés continue d'évoluer sous traitement antirétroviral [Raymond *et al.* 2014].

Une association entre la présence de variants minoritaires et le risque d'échec virologique n'a pour l'instant pas été observée avec les **autres classes d'antirétroviraux**.

Une étude décrit le dynamisme des mutations de résistance aux INTI chez 6 patients avant, pendant et après l'échec à un traitement contenant AZT et 3TC [Hedskog *et al.* 2010]. Certaines mutations comme la mutation M184I, conférant une résistance au 3TC, peuvent être détectées à des très faibles niveaux (0.07-0.09%) dans l'ARN-VIH avant traitement, puis elles sont remplacées par des mutations conférant un plus haut niveau de résistance comme la mutation M184V qui devient le variant dominant de la quasiespèce en combinaison avec d'autres, comme la mutation T215Y conférant une résistance à la AZT. À l'arrêt des traitements, ces populations résistantes deviennent indétectables rapidement, en moins de 3 mois, et sont remplacées par des virus sauvages identiques à ceux présents avant traitement, confirmant le rebond viral à partir du réservoir latent majoritairement composé de variants sauvages archivés.

Perrier *et al.* ont analysé les variants minoritaires présents chez 110 individus débutant un traitement de première ligne par DRV ou ATV, et n'ont pas montré de lien entre leur présence et le risque d'échec virologique [Perrier *et al.* 2018].

Fisher *et al.* ont comparé la technique UDS au séquençage standard chez 7 patients en échec d'une deuxième ligne comprenant du lopinavir/ritonavir [Fisher *et al.* 2012]. Des variants minoritaires (> 0,5% de la population totale) aux inhibiteurs de protéase ont été détectés dans l'ARN-VIH au moment de l'échec en UDS chez 5 sur 7 patients liés à une adhésion faible et expliquant l'échec. Ces variants résistants représentent des étapes précoces de la sélection de clones résistants qui ne dominent pas encore parmi la quasiespèce du fait d'une pression thérapeutique peu importante par défaut d'observance. Ensuite, une seule étude longitudinale utilisant des techniques UDS a comparé l'émergence en parallèle des mutations de résistance aux inhibiteurs d'intégrase dans les compartiments plasmatiques et cellulaires chez 4 patients [Lee *et al.* 2012]. Les auteurs démontrent une discordance importante et prolongée de la fréquence de résistance sélectionnée entre le plasma et les cellules sanguines (par exemple, les mutations Q148H/G140S présentes à 100% dans le plasma et seulement à 1% dans les cellules à la même date d'échec virologique). De plus, une analyse d'homologie de séquences révèle que la plupart des séquences dans le plasma n'ont aucune homologie avec les séquences cellulaires. Ces résultats suggèrent que l'archivage des mutations dans les cellules est un mécanisme complexe qui fait intervenir la dynamique virale et la dynamique des cellules infectées dans l'organisme au cours du temps. Cela est difficile à anticiper malgré l'utilisation de techniques sensibles.

Enfin, une sous étude en UDS des variants résistants minoritaires dans l'ARN VIH-1 sur les patients de l'essai ANRS 139 TRIO a été réalisée [Charpentier *et al.* 2015]. Les patients de cette étude débutaient une trithérapie de sauvetage combinant ETR, RAL et DRV/r. Les variants résistants émergents lors de l'échec virologique n'étaient pour la plupart pas présents à l'initiation du traitement. La présence de variants minoritaires résistants n'était donc pas associée à un échec virologique. Une tendance à un risque plus élevé d'échec virologique a été rapportée pour l'ETR.

En conclusion, un échec virologique causé par la sélection de variants résistants minoritaires semble dépendre de la classe pharmacologique, probablement en lien avec la barrière génétique et/ou la puissance des antirétroviraux.

### 3. Détection des résistances dans l'ADN VIH-1

Chez une personne en succès thérapeutique, l'ARN-VIH plasmatique est indétectable et les techniques de séquençage ne permettent pas d'amplifier les gènes d'intérêt. Ainsi, chez des individus ayant eu des échecs virologiques au cours de leur histoire thérapeutique, mais actuellement contrôlés virologiquement, il n'est pas toujours facile de modifier le traitement. Définir le profil de résistance d'une personne en succès thérapeutique s'avère donc compliqué si l'on ne dispose pas de l'historique des tests génotypiques de résistance réalisés sur l'ARN-VIH plasmatique au moment des échecs virologiques antérieurs.

Il a donc été proposé de réaliser un **génotype sur l'ADN-VIH cellulaire** afin d'apprécier l'ensemble des mutations de résistance ayant circulé dans le plasma au cours des précédents échecs thérapeutiques. De plus, du point de vue technique, un génotype sur l'ADN-VIH est réalisable dans la mesure où celui-ci reste détectable en succès thérapeutique. Les profils de résistance détectés dans l'ADN-VIH en séquençage classique ne reflètent pas de façon exhaustive toutes les souches résistantes antérieurement détectées dans l'ARN-VIH plasmatique [Wirlden *et al.*, 2011 ; Delaugerre *et al.*, 2012]. Les génotypes ARN-VIH cumulés sont donc plus informatifs qu'un unique génotype ADN-VIH. Par conséquent, seules les mutations identifiées dans l'ADN-VIH pourront être prises en compte mais sans exclure l'existence possible de mutations non détectées. En effet, le séquençage classique, par technique Sanger, détecte les variants VIH représentant au moins 20% de la quasispèce. Ainsi chez des patients en succès thérapeutique depuis plusieurs années mais ayant eu des échecs virologiques antérieurs, le séquençage de l'ADN-VIH cellulaire retrouvera de façon prédominante des souches sauvages intégrées précocement dans le réservoir cellulaire, les variants résistants étant devenus minoritaires, notamment du fait du renouvellement des cellules infectées. C'est pourquoi il reste indispensable de tenir compte des résultats de tous les tests génotypiques de résistance réalisés antérieurement ainsi que de l'histoire thérapeutique pour alléger ou modifier une combinaison antirétrovirale.

L'amélioration de la sensibilité apportée par les techniques UDS pourrait permettre, dans certains cas, de détecter de nouvelles mutations non observées classiquement dans l'ADN VIH-1, et qui n'ont pas été identifiées au cours du suivi des patients, par exemple quand un génotype de résistance n'a pas été réalisé au moment d'un échec antérieur. Il a notamment été

montré que les mutations de résistances archivées dans l'ADN-VIH peuvent encore être détectables au bout de 6 années de succès virologique sous traitement efficace (Figure 27) [Gantner *et al.* 2016]. Dans cette étude, trois profils ont été observés : (i) les mutations aux différentes classes pharmacologiques étudiées persistent car elles semblent liées sur le même variant, et l'utilisation d'une molécule de ces classes maintient la pression de sélection sur l'ensemble du variant et entretient son archivage à long terme ; (ii) de nouvelles mutations apparaissent au cours du traitement optimisé ; (iii) les mutations semblent régresser si le traitement optimisé comprend de nouvelles classes pharmacologiques. Le degré de persistance dépend vraisemblablement de la combinaison antirétrovirale utilisée.





## C. *Réservoirs viraux lors de l'échec virologique*

### 1. **Le compartiment sanguin**

Comme vu précédemment, lors des échecs virologiques, l'ARN-VIH ré-augmente puisque la réplication reprend. Les niveaux d'ADN-VIH ré-augmentent également lors d'échecs virologiques ou d'arrêts thérapeutiques. Ainsi, chez des personnes à un stade d'échec avancé, les niveaux d'ADN-VIH étaient élevés, entre 3,44 et 3,51 log copies/million de CMSP en médiane (Figure 10) [Avettand-Fenoel *et al.* 2012].

La plupart des données sur le réservoir au moment de cette phase de rebond virologique post-traitement proviennent d'essais ayant analysé des interruptions thérapeutiques programmées, dans le cadre d'analyse de guérison fonctionnelle. Kominakis *et al.* ont démontré que chez 41 individus arrêtant leur traitement, 28 présentaient une augmentation de l'ADN-VIH dès 12 semaines après l'interruption [Kominakis *et al.* 2012]. Récemment, Clarridge *et al.* ont analysé l'impact sur le réservoir d'une interruption thérapeutique chez 10 personnes en arrêt thérapeutique, en comparant les données avant l'arrêt, lors de l'arrêt (durée médiane de 57 jours d'arrêt) et après la reprise du traitement (durée médiane de reprise du traitement de 363 jours) [Clarridge *et al.* 2018]. Dans cette étude, tous les marqueurs étudiés : ADN-VIH, ARN-VIH associé aux cellules, qVOA et marqueurs d'activation cellulaires et solubles ont tous été augmentés lors de l'arrêt de traitement. De façon intéressante, les auteurs n'ont pas noté de modification dans le profil des variants ADN-VIH, en terme de variabilité génétique, de défektivité et d'apparition de résistance en pré- et post-interruption (Figure 28). Ainsi la proportion de séquences intactes était de 7% avant et après l'interruption thérapeutique. En revanche, dans une étude ayant analysé 24 individus avant et après une interruption thérapeutique de 48 semaines suivie d'une reprise d'un traitement pendant 104 semaines, les niveaux d'ADN-VIH total étaient similaires avant interruption et après la reprise, mais le niveau d'ADN-VIH intégré demeurait supérieur au niveau d'avant l'interruption [Montserrat *et al.* 2017]. À notre connaissance il n'y a pas de données sur la contribution des différentes sous-populations lymphocytaires au moment de l'échec virologique.

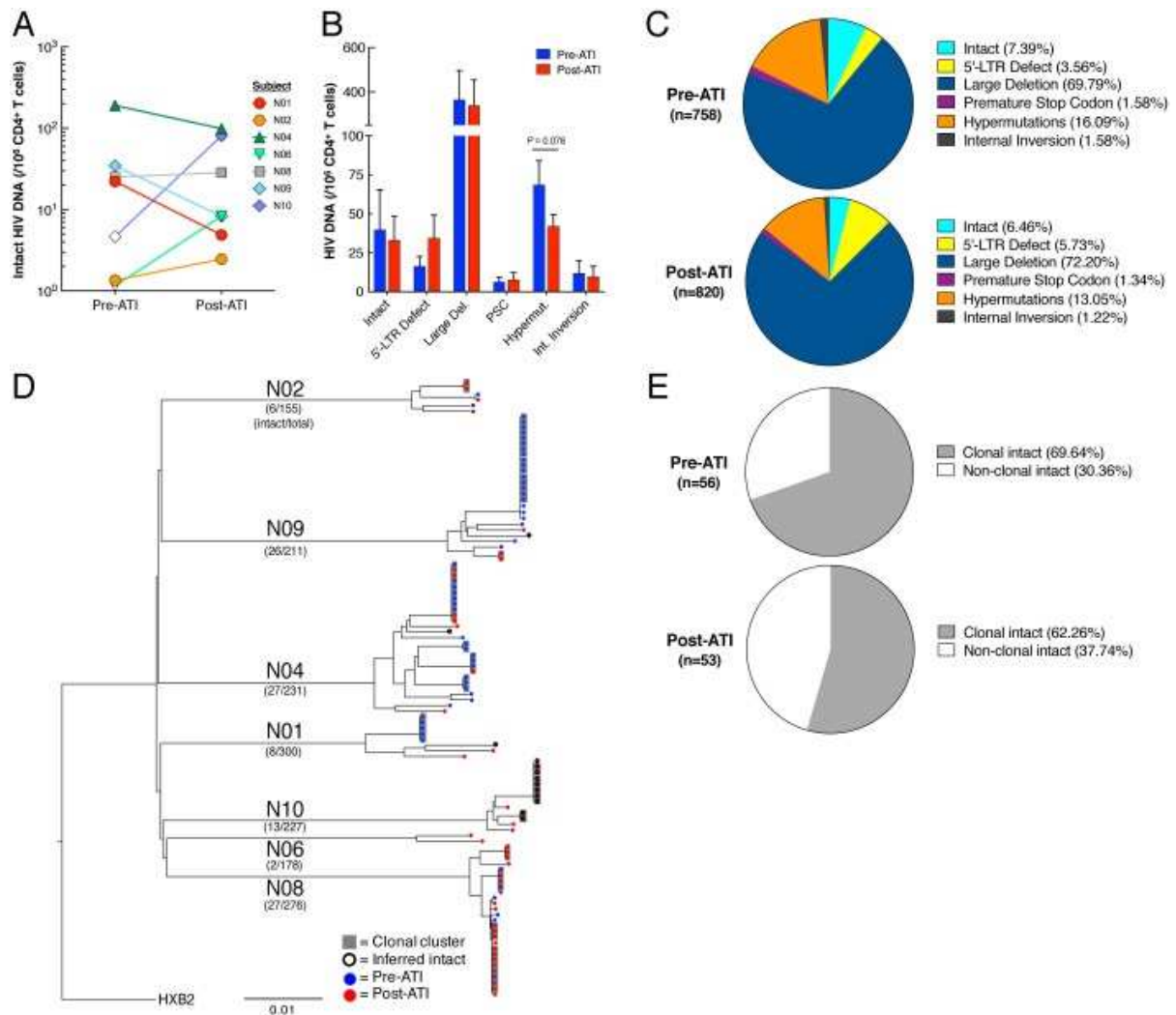


Figure 28. Profil des séquences provirales en pré- et post-interruption thérapeutiques. Adaptée de Clarridge et al 2018.

(A) Représentation par paire de la fréquence de séquences intactes par rapport au nombre de cellules  
 (B) Représentation de la fréquence des différents types de génomes retrouvés par rapport au nombre de cellules  
 (C) Représentation de la proportion des différents types de génomes par rapport au nombre total de séquences identifiées  
 (D) Arbre phylogénétiques des différents clones intacts identifiés pour chaque participant  
 (E) Représentation de la proportion des génomes intacts résultant d'une expansion clonale par rapport au nombre de séquences intacts identifiées.

En conclusion, le réservoir sanguin se re-remplit lors d'un échec virologique ou d'une interruption thérapeutique. Un retour à l'état précédent est possible selon la durée de l'interruption ou de l'échec avec la reprise à moyen ou long terme d'un traitement antirétroviral efficace.

## 2. Le tractus génital masculin

Il existe peu de données sur le rebond virologique dans le sperme lors d'arrêts thérapeutiques. Trois études ont montré qu'à l'arrêt d'un traitement efficace, un pic d'ARN-VIH est détecté dans le sang et le plasma séminal [Liuzzi *et al.* 2003 ; Costiniuk *et al.* 2013 ; Choudhury *et al.* 2002]. Une étude récente a recherché l'origine de ce rebond virologique séminal et sanguin chez les participants lors d'une étude avec interruption thérapeutique programmée [Ghosn *et al.* 2017]. Le rebond a lieu très rapidement dans les deux compartiments entre la 2<sup>ème</sup> et la 4<sup>ème</sup> semaine, mais sans indice d'une réplication locale séminale. En effet, les séquences séminales et celles obtenues dans le plasma sanguin et les CMSP étaient entremêlées génétiquement. Les analyses phylogénétiques ont montré que l'ADN-VIH sanguin était le principal contributeur à l'ARN-VIH dans le sang et le sperme [Ghosn *et al.* 2017]. Cette découverte renforce l'idée d'une absence de compartimentalisation majeure du VIH dans le tractus génital masculin.

Un échec virologique peut également survenir chez des personnes traitées en raison de la faible pénétration de certaines molécules antirétrovirales dans ce compartiment. En effet, il a été montré que des variants résistants pouvaient être détectés dans le sperme de patients en échec virologique dans le sang [Ghosn *et al.* 2004] mais aussi chez des personnes traitées en succès virologique [Lafeuillade *et al.* 2002]. Plusieurs études ont montré des taux de pénétration variés des antirétroviraux dans le tractus génital qui exercent ainsi des pressions médicamenteuses variées [Lê *et al.* 2017 ; Trezza *et al.* 2014].

## 3. Le tractus génital féminin

À notre connaissance, aucune étude n'a comparé les quasiespèces du sang et celles issues des sécrétions cervicovaginales après interruption thérapeutique, et ce sujet doit être investigué. On peut cependant penser que, comme pour le tractus génital masculin, un transfert passif des variants sanguins et une réplication locale transitoire de ces variants récemment importés se produisent lors du rebond virologique.

D'un autre côté, chez les femmes en échec virologique sous traitement, les mutations de résistances observées entre sang et sécrétions endocervicales peuvent être différentes [De Pasquale *et al.* 2003]. Ce résultat serait plutôt en faveur d'une compartimentalisation partielle du réservoir dans le tractus génital féminin au moment de l'échec virologique. Là encore, la

pharmacocinétique des antirétroviraux dans le tractus génital féminin pourrait jouer un rôle [Trezza *et al.* 2014].

#### 4. Le tissu digestif

Le rôle du GALT comme source de rebond virologique à l'arrêt du traitement a été investigué. Dans une étude transversale, McBride *et al.* ont montré que moins de 20% de l'ADN-VIH total contenu dans le GALT, était présent dans des cellules mémoires capables de migration [McBride *et al.* 2013]. Ainsi des études ont montré que le rebond virémique n'avait pas pour origine le GALT mais plutôt d'autres compartiments [Lemer *et al.* 2011].

Plusieurs équipes ont démontré que les profils de résistance étaient différents entre sang et tissu digestif au moment de l'échec virologique et que des différences étaient même observées entre les différentes parties du tube digestif [van Marle *et al.* 2010 ; Poles *et al.* 2001]. L'hypothèse de ces essais est que la pression de sélection à la fois médicamenteuse et immunitaire est différente entre le tractus digestif et le sang.

##### **En résumé, lors de l'échec virologique sous traitement :**

- Un rebond de l'ARN et de l'ADN-VIH sanguin est observé lors d'un échec virologique ou d'une interruption thérapeutique [Avettand-Fenoel *et al.* 2016]
- La plupart des virus intégrés restent probablement défectifs [Clarridge *et al.* 2018]
- L'évolution de la diversité génétique des provirus sanguins et séminaux n'est pas démontrée lors des interruptions thérapeutiques programmées [Ghosn *et al.* 2017 ; Clarridge *et al.* 2018]
- L'ARN et l'ADN-VIH sont présents dans le sperme, le tractus digestif et les sécrétions cervicovaginales lors de l'échec virologique [Ghosn *et al.* 2004 ; De Pasquale *et al.* 2003]
- L'échec virologique peut entraîner la sélection de résistances détectables dans tous les compartiments [Ghosn *et al.* 2004, Falasca *et al.* 2013]

## Conclusions et perspectives

Le plus grand défi dans l'infection à VIH aujourd'hui correspond à l'identification de stratégies curatives. La principale barrière à franchir pour l'obtention d'une cure fonctionnelle est l'éradication du réservoir VIH latent et persistant [Siliciano *et al.* 2016]. Des stratégies de réduction de la taille du réservoir et/ou de stimulation du système immunitaire, en association à des traitements antirétroviraux pourrait augmenter la probabilité d'atteindre cette guérison [Barouch *et al.* 2014; Simonetti *et al.* 2015].

De part son unique profil de résistance, il a été suggéré que le dolutegravir, un inhibiteur de l'intégrase récemment commercialisé, pourrait faire partie de ces stratégies [Wainberg *et al.* 2016; Pham *et al.* 2018]. Le dolutegravir a prouvé son efficacité et sa tolérance dans de nombreux essais cliniques incluant des participants dans différents contextes cliniques [Raffi *et al.* 2013; Cahn *et al.* 2013; Castagna *et al.* 2014; Akil *et al.* 2015; Walmsley *et al.* 2015; Molina *et al.* 2015; Orrell *et al.* 2017; Trottier *et al.* 2017]. Cependant, l'impact du dolutegravir sur les réservoirs viraux dans différents contextes cliniques, comme par exemple s'il est initié en primo-infection, est inconnu [Narang *et al.* 2014]. Or, comme nous l'avons vu dans cette première partie des différences en terme de réservoir viral existent entre quatre phases clés de l'infection par le VIH : la primo-infection, l'infection chronique, le succès virologique sous traitement antirétroviral et l'échec virologique sous traitement antirétroviral. De ce fait, une meilleure compréhension de la dynamique du réservoir VIH sous dolutegravir en fonction du contexte clinique est nécessaire.

## Partie 2. Etude DRONE : Impact d'un traitement comprenant du dolutegravir sur la dynamique du réservoir viral.

---

Cette seconde partie a pour objectif de présenter les principaux résultats obtenus lors de cette présente thèse. Après avoir décrit le protocole de recherche non interventionnelle de l'étude DRONE, nous présenterons les résultats en trois sous-parties qui correspondent aux trois articles qui en découlent ;

- Article I : l'analyse quantitative du réservoir VIH sanguin ainsi que l'activation immune sous traitement par inhibiteur de l'intégrase,
- Article II : l'étude fine des réservoirs au niveau des sous-populations lymphocytaires T CD4+,
- Article III : l'analyse de la diversité génétique des quasiespèces virales archivées dans les cellules sanguines.

Pour finir, nous interpréterons et discuterons les résultats combinés de ces analyses dans une discussion générale.

## Introduction et rationnel scientifique de l'étude

### A. Définition de la pathologie ou de l'événement étudié

La mise sous traitement antirétroviral a pour objectif de bloquer la réplication virale et de restaurer l'immunité du patient. Si les antirétroviraux actuels bloquent efficacement la réplication virale ils sont incapables d'éliminer le virus de l'organisme.

Ceci s'explique par :

- un manque d'activité sur les virus intégrés dans les cellules à l'état de latence (réservoirs cellulaires),
- et de par une mauvaise diffusion dans les compartiments anatomiques sanctuaires comme le système nerveux central et le compartiment génital (réservoirs anatomiques).

En effet, le VIH est capable d'intégrer son génome dans celui de la cellule hôte, on parle de virus latent. La mesure de l'ADN-VIH est une évaluation de ce réservoir viral. Ces cellules infectées de façon latente ne sont pas ciblées par le système immunitaire, car elles ne présentent pas aux cellules de l'immunité adaptatrice les déterminants antigéniques viraux et le virus qui y est archivé est insensible aux antirétroviraux actuels ciblant uniquement le cycle de multiplication [Williams *et al.* 2014].

Ceci implique :

- Un traitement à vie par les molécules antirétrovirales avec un risque d'exacerbation de leur toxicité sur le long terme, une lassitude pour les personnes vivant avec le VIH qui subissent encore des discriminations [Gantner *et al.* 2015] et un coût en santé publique.
- Une activation immunitaire généralisée caractéristique de l'infection chronique par le VIH [Liang *et al.* 2014], qui persiste malgré l'efficacité immunovirologique des antirétroviraux actuels, et majore le risque cardiovasculaire. Cette activation semble d'ailleurs proportionnelle à la taille du réservoir viral [Imamichi *et al.* 2016 ; Sereti *et al.* 2017 ; Cockerham *et al.* 2014]
- La persistance d'une réplication virale dans les sites sanctuaires, ayant comme conséquence un risque résiduel de transmission sexuelle du virus, lié à sa persistance dans le compartiment génital malgré un contrôle immunovirologique sanguin par les



antirétroviraux actuels [Ghosn *et al.* 2014 ; Gianella *et al.*, 2014 ; Gianella *et al.*, 2013 ; Butler *et al.*, 2010].

La principale conséquence de la toxicité des antirétroviraux et de la persistance d'une activation immunitaire généralisée est l'émergence de complications associées au VIH telles que les maladies cardiovasculaires. La proportion de décès par atteinte cardiovasculaire des adultes vivant avec le VIH a significativement augmenté. En France, elle représente 10% des décès des personnes vivant avec le VIH [Morlat *et al.* 2014 ; Roussillon *et al.* 2012 ; Rodger *et al.* 2013]. L'optimisation des stratégies thérapeutiques est donc nécessaire pour limiter la survenue des complications chez les patients vivant avec le VIH [Smith *et al.* 2010 ; Bavinger *et al.* 2013 ; Lang *et al.* 2010].

Une prise en charge thérapeutique optimisée doit permettre (1) d'atteindre un succès virologique à long terme, (2) de maintenir un nombre de lymphocytes T CD4+ > 500 cellules/mm<sup>3</sup>, (3) de prévenir la toxicité des antirétroviraux à long terme, (4) un schéma thérapeutique simplifié pour garantir l'observance et (5) de réduire autant que possible le réservoir VIH et l'activation immunitaire généralisée [Chun *et al.* 2012 ; Lewin *et al.* 2011 ; Smith *et al.* 2012]

## **1. Limites de la prise en charge**

Les recommandations françaises [Morlat, 2017. Rapport sur la prise en charge des personnes vivant avec le VIH] préconisent l'instauration d'un traitement antirétroviral pour toutes les personnes vivant avec le VIH, indépendamment de leur statut immunovirologique.

Les combinaisons préconisées lors de l'initiation du traitement répondent au dogme de la trithérapie : 2 INTI + 1 IP ou 1 INNTI ou 1 II. Au centre de soins de l'infection à VIH de Strasbourg en 2016, 82% des personnes suivies utilisent une de ces combinaisons (*Tableau 6*). Ces combinaisons thérapeutiques ont parfaitement montré leur efficacité mais la limite de leur utilisation est liée à la persistance de l'activation immune généralisée malgré la négativation de la charge virale VIH, à leur toxicité à long terme et à l'absence de données claires sur leur activité sur le réservoir viral.

Une classe de molécules antirétrovirales, les II, n'a en revanche été que peu étudiée dans ces domaines. Ces molécules empêchent l'intégration du génome viral dans celui de la cellule pouvant ainsi être influencé la constitution du réservoir viral, notamment l'effet de la réplication résiduelle. Leurs propriétés pharmacologiques et leur faible toxicité ont font des molécules de choix prometteuses pour l'optimisation thérapeutique chez les personnes vivant avec le VIH.

## 2. Rationnel pour l'utilisation du dolutegravir

A ce jour, trois II ont obtenu leur autorisation de mise sur le marché en France pour le traitement de l'infection par le VIH en combinaison à d'autres antirétroviraux.

### Activité des II de première génération

Les II de première génération, RAL et EVG, ont montré leur efficacité chez des individus naïfs et prétraités et semblent bien tolérés [Gillette *et al.* 2014 ; Osterholzer *et al.* 2014]. L'utilisation de ces deux molécules est cependant limitée par leur faible barrière génétique [Blanco *et al.* 2011], par le nombre de prise pour le RAL et par la nécessité de l'utilisation d'un booster, le cobicistat, pour l'EVG.

Comme nous l'avons vu dans la partie précédente, l'utilisation du RAL chez des participants naïfs de traitement antirétroviral a montré une baisse de marqueurs du réservoir viral [Koelsch *et al.* 2011]. En intensification chez des personnes en succès thérapeutique le RAL a aussi montré un effet positif sur le réservoir [Vallejo *et al.* 2012 ; Buzon *et al.* 2010]. Cependant, les stratégies de switch vers des combinaisons incluant du RAL chez des personnes en charge virale indétectable n'ont pas montré de changement des niveaux de réservoir [Delaugerre *et al.* 2010 ; Lam *et al.* 2012].

L'impact du RAL a également été évalué sur l'activation immunitaire. Il n'y a pas de consensus sur l'utilisation de marqueurs inflammatoires précis, mais on retrouve fréquemment la protéine C réactive ultra-sensible (CRP<sub>us</sub>), le CD14s, les D-dimères, l'interleukine 6 (IL-6), la Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), le TNF $\alpha$  ou la néoptérine [Rajasuriar *et al.* 2015]. Ainsi le switch d'un traitement contenant une IP/r vers le RAL a été associé à une diminution significative des marqueurs de l'inflammation à 48 semaines post-switch : CRP<sub>us</sub> ( $p < 0,0001$ ), MCP-1 ( $p = 0,0002$ ), IL-6 ( $p = 0,0024$ ), TNF- $\alpha$  ( $p = 0,0011$ ) et D-dimères ( $p = 0,0187$ ) [Martinez *et al.* 2012]. Des résultats similaires ont été observés lors d'un switch

de INNTI vers RAL [Gupta *et al.* 2013 ; Lake *et al.* 2014] ou de l'IE vers RAL [Silva *et al.* 2013]. Ces résultats suggèrent que contrairement aux IP/r, INNTI, et IE les II pourraient diminuer l'activation immunitaire généralisée qui est l'élément délétère central lors de l'infection par le VIH.

### **Activité de l'II de deuxième génération**

Plus récemment, un II de deuxième génération, le DTG, a obtenu une autorisation de mise sur le marché pour le traitement des personnes vivant avec le VIH. Son efficacité a été prouvée pour des personnes naïves de traitement antirétroviral, chez des personnes prétraitées ayant reçu préalablement ou non des II ou dans des situations de switch en succès virologique (Tableau 7) [Raffi *et al.* 2013 ; Walmsley *et al.* 2013 ; Cahn *et al.* 2013 ; Clotet *et al.* 2014 ; Castagna *et al.* 2014 ; Akil *et al.* 2015 ; Walmsley *et al.* 2015 ; Molina *et al.* 2015 ; Orrell *et al.* 2017 ; Trottier *et al.* 2017].

**TABLEAU 7 : ETUDES DE PHASE III SUR LES COMBINAISONS INCLUANT LE DTG**

| Cible                          | Etude              | Concept   | Publications   |
|--------------------------------|--------------------|---|--|
| Personnes naïves de traitement | SINGLE<br>N=833    | DTG (50 mg) + ABC/3TC 1 fois/jour<br>versus EFV/TDF/FTC 1 fois/jour           | Walmsley <i>et al.</i> 2013<br>Walmsley <i>et al.</i> 2015 |
|                                | SPRING-2<br>N=822  | DTG (50 mg) 1 fois/jour<br>versus RAL 2 fois/jour                             | Raffi <i>et al.</i> 2013                                   |
|                                | FLAMINGO<br>N=484  | DTG (50 mg) 1 fois/jour<br>versus DRV/r (800/100 mg) 1 fois/jour              | Clotet <i>et al.</i> ; 2014<br>Molina <i>et al.</i> 2015   |
|                                | ARIA<br>N=495      | DTG/ABC/3TC 1 fois/jour<br>versus ATV/r (300/100 mg) + TDF/FTC<br>1 fois/jour | Orrell <i>et al.</i> 2017                                  |
| Personnes prétraitées          | SAILING<br>N=715   | DTG (50 mg) 1 fois/jour<br>versus RAL 2 fois/jour                             | Cahn <i>et al.</i> 2013                                    |
|                                | VIKING-3<br>N=183  | DTG (50 mg) 2 fois/jour   | Castagna <i>et al.</i> 2014                                |
|                                | VIKING-4<br>N=30   | DTG (50 mg) 2 fois/jour<br>versus placebo les 7 premiers jours                | Akil <i>et al.</i> 2015                                    |
|                                | STRIIVING<br>N=555 | DTG/ABC/3TC 1 fois/jour<br>versus maintien du traitement                      | Lake <i>et al.</i> 2016<br>Trottier <i>et al.</i> 2017     |

Le DTG présente plusieurs avantages par rapport aux molécules de première génération: il est utilisé en prise unique, a une barrière génétique élevée et ne nécessite pas de boost. Par ailleurs, il a été observé dans les différents essais de phase III :

- une réduction de la charge virale sous DTG qui semble plus rapide que sous RAL [Cahn *et al.* 2013 ; Raffi *et al.* 2013]
- une efficacité et une tolérance de la combinaison thérapeutique incluant le DTG supérieures à celles des traitements incluant les INNTI ou les IP/r [Walmsley *et al.* 2015 ; Clotet *et al.* 2014].

**Cependant, l'impact du DTG sur le réservoir viral et l'activation immunitaire généralisée n'est pas connu [Narang *et al.* 2014].**

## ***B. Objectifs de l'essai***

Les objectifs de notre étude sont d'analyser la cinétique de l'ADN-VIH sous DTG, au cours du traitement antirétroviral incluant le DTG, d'évaluer l'impact de ce nouveau médicament sur l'activation immunitaire généralisée. Les résultats attendus contribueront non seulement à comprendre les mécanismes d'action du DTG mais également d'évaluer son rôle dans le contexte d'une optimisation de stratégie thérapeutique. De plus, les données acquises contribueront à l'amélioration des connaissances sur l'impact des antirétroviraux et notamment de la classe des II sur le réservoir viral et l'activation immunitaire. Elles contribueront également à l'optimisation de la prise en charge thérapeutique des personnes vivant le VIH.

### **1. Objectif Principal**

L'objectif principal de l'essai est d'évaluer la diminution du réservoir viral de personnes débutant un traitement par DTG.

### **2. Objectifs Secondaires**

Les objectifs secondaires sont :

- déterminer la cinétique de diminution de l'inflammation et de l'activation immunitaire après mise sous DTG
- d'analyser la répartition du réservoir viral dans les sous-populations lymphocytaires sanguines.
- d'analyser la dynamique des quasiespèces virales archivées dans les cellules sanguines
- de décrire l'efficacité et la tolérance du traitement par DTG

## ***C. Conception de la recherche***

Il s'agit d'une étude multicentrique, comparative, non-randomisée et ouverte incluant des personnes initiant un traitement comprenant du DTG à différents stades cliniques et thérapeutiques de l'infection à VIH suivies pendant un an.

## 1. Critère d'évaluation principal

Le critère d'évaluation principal est la diminution de l'ADN VIH-1 (une diminution  $\geq 0,5$  log copies/mL est considérée comme significative) entre J0, S4, S12, S24, S36 et S48 chez les quatre groupes de patients (Tableau 8) : naïfs de traitement antirétroviral en primo-infection, naïf en infection chronique, prétraité en succès thérapeutique et prétraité en en échec thérapeutique.

**TABLEAU 8 : GROUPES D'INCLUSIONS EN FONCTION DU STADE CLINIQUE ET THERAPEUTIQUE DE L'INFECTION A VIH**

|                                  |   |       |
|----------------------------------|---|-------|
| AI<br><i>Acute infection</i>     | Personnes naïves en primo-infection         | n=11  |
| CI<br><i>Chronic infection</i>   | Personnes naïves en infection chronique     | n=21  |
| VS<br><i>Virological success</i> | Personnes prétraitées en succès virologique | n=101 |
| VF<br><i>Virological failure</i> | Personnes prétraitées en échec virologique  | n=69  |

L'ADN proviral VIH-1 sera exprimé en nombre de copies d'ADN VIH-1 par millions de CMSP [Avettand-Fenoel *et al.* 2009]. La quantité de CMSP est déterminée par la quantification du nombre de gène codant pour l'albumine (adaptation de la technique commercial pour une mesure en bplex avec une PCR maison pour le gène de l'albumine).

## 2. Critères d'évaluation secondaires

Les critères d'évaluation secondaires sont :

- mesure à J0 et S48 des marqueurs inflammatoires et d'activation monocyttaire : IL-6 ultrasensible (IL-6us), néoptérine, IP-10, CD14s et CD163s) par technique ELISA
- distribution à J0 et S48 de l'ADN VIH-1 dans les sous-populations lymphocytaires : TEM, TTM, TCM et TN par cytométrie en flux puis PCR
- analyse des séquences de *pol* et *env* archivées dans les CMSP de l'ADN VIH-1 par séquençage à haut débit
- relève à J0, S4, S12, S24, S36 et S48 des données de suivi habituel : ARN VIH-1, nombre de lymphocytes T CD4+ et CD8+, créatinine, ALAT, ASAT, CPK.

## ***D. Population étudiée***

### **1. Critères d'inclusion**

Les critères d'inclusion sont :

- âge compris entre 18 ans et 80 ans
- personne acceptant de ne pas participer à un projet de grossesse pendant le traitement et 6 semaines après avoir éventuellement arrêté le DTG
- s'il s'agit d'une femme en âge de procréer, avec un test de grossesse négatif : contraception efficace tout au long de l'étude
- signature d'un consentement éclairé pour la participation à l'étude
- critères spécifiques pour la répartition dans les différents groupes d'inclusion (Tableau 9)

**TABLEAU 9 : CRITERES SPECIFIQUES A L'INCLUSION DANS LES DIFFERENTS GROUPES DE L'ETUDE**

|  |   |
|--|---|
| <p>AI<br/><i>Acute infection</i></p>     | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Primo-infection VIH-1 documentée par un Western Blot incomplet dans les 15 jours précédents l'inclusion ; un antigène p24 positif ou un ARN VIH-1 positif et un test ELISA négatif ou un Western Blot négatif ; test ELISA négatif dans les 3 mois précédents l'inclusion.</li> <li>- Absence de prise de traitement antirétroviral depuis le diagnostic.</li> </ul> |
| <p>CI<br/><i>Chronic infection</i></p>   | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Infection par le VIH-1 documentée par : un test ELISA et confirmée par Western Blot ; ou antigène p24 ; ou ARN VIH-1</li> <li>- Absence de prise de traitement antirétroviral depuis le diagnostic.</li> </ul>   |
| <p>VS<br/><i>Virological success</i></p> | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Infection par le VIH-1 documentée par : un test ELISA et confirmée par Western Blot ; ou antigène p24 ; ou ARN VIH-1.</li> <li>- Traitement antirétroviral en cours, indépendamment de la combinaison utilisée.</li> <li>- ARN VIH-1 plasmatique &lt; 50 copies/mL au jour de l'inclusion et sur le prélèvement antérieur.</li> </ul>                                |
| <p>VS<br/><i>Virological failure</i></p> | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Infection par le VIH-1 documentée par : un test ELISA et confirmée par Western Blot ; ou antigène p24 ; ou ARN VIH-1.</li> <li>- Traitement antirétroviral en cours, indépendamment de la combinaison utilisée.</li> <li>- ARN VIH-1 plasmatique &gt; 50 copies/mL au jour de l'inclusion et sur le prélèvement antérieur.</li> </ul>                                |

## 2. Critères de non inclusion

Les critères de non inclusion sont :

- homme ou femme sexuellement actif qui n'utiliserait pas au moins une forme de contraception
- femme enceinte documenté par test urinaire ou dosage sanguin de bêta-HCG ou femme allaitante
- hépatite B active documentée par un Antigène HBs positif
- hépatite C ou antécédent d'hépatite C documentée par un anticorps VHC positif ou un ARN-VHC positif



- participation à une autre étude clinique incluant l'utilisation d'un médicament pour lequel la dernière dose a été administrée dans les 30 derniers jours ou pour lequel un dispositif médical a été implanté
- impossibilité de donner au sujet des informations éclairées (sujet en situation d'urgence, difficultés de compréhension du sujet...)
- une maladie active classant SIDA à l'initiation du traitement (excepté une maladie de Kaposi cutanée ne nécessitant pas de traitement systémique ou un nombre de CD4 <200 cellules/mm<sup>3</sup>)
- allergie ou intolérance au DTG ou à l'un de des composants des deux formes pharmaceutiques actuellement commercialisées ou à un autre II
- anomalie biologique de grade 4 à J0 (excepté les paramètres lipidiques).
- sujet sous sauvegarde de justice
- sujet sous tutelle ou sous curatelle

Le retrait du consentement, un arrêt de participation à l'étude (participant perdu de vue, arrêt du DTG par décision du participant), ou l'apparition d'un critère de non inclusion ou un arrêt du traitement incluant du DTG ou de l'étude s'y rapportant à la discrétion du clinicien entraînent une sortie de l'étude. Pour l'objectif principal, l'analyse sera effectuée en per protocol sur une population ayant atteint le S48 de traitement par DTG en succès virologique.

### **3. Promotion de l'étude et considérations éthiques**

Les Hôpitaux Universitaires de Strasbourg sont promoteurs de l'étude. L'étude a reçu un avis favorable du Comité de Protection des Personnes Est 4 et de l'Agence Nationale de Sécurité du Médicament en 2013.

## ***E. Déroulement pratique de l'essai***

### **1. Modalités de recrutement**

Le recrutement est effectué par les médecins auprès des personnes venant en consultation dans les centres suivants :

- *Centre 01* : Au Trait d'Union, Centre de Soins de l'Infection par le VIH, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg
- *Centre 02* : Au Service des déficits immunitaires, Centre Hospitalier de Mulhouse
- *Centre 03* : Au Service de Maladies infectieuses et tropicales, Centre Hospitalier de Belfort-Montbéliard
- *Centre 04* : Au Service de Médecine interne, Hôpitaux Civils de Colmar

Le choix de la mise sous DTG est à la discrétion du clinicien.

## **2. Description des visites**

Les visites correspondent au suivi standard pour les procédures médicales et de laboratoire et d'autres tubes permettent de réaliser les analyses biologiques sont prélevés lors de ces mêmes visites (Tableau 10). Le suivi habituel des patients prévoit six visites au total, tolérées à plus ou moins deux semaines par rapport à la date calculée.

**TABLEAU 10 : DESCRIPTION DES PROCEDES DE L'ESSAI**

| Description des visites  | Inclusion<br>J0 | S4 | S12 | S24 | S36 | S48 |
|--|-----------------|----|-----|-----|-----|-----|
| Information du sujet   | x               |    |     |     |     |     |
| Recueil du consentement éclairé                                      | x               |    |     |     |     |     |
| Evaluation des critères d'inclusion et de non-inclusion              | x               |    |     |     |     |     |
| Histoire médicale  | x               |    |     |     |     |     |
| Examen clinique  | x               | x  | x   | x   | x   | x   |
| Relève des effets indésirables                                       | x               | x  | x   | x   | x   | x   |
| Prélèvement sanguin :  | x               | x  | x   | x   | x   | x   |
| Nombre de Lymphocytes T CD4+   | x               | x  | x   | x   | x   | x   |
| ARN-VIH sanguin  | x               | x  | x   | x   | x   | x   |
| ADN-VIH sanguin  | x               | x  | x   | x   | x   | x   |
| ADN-VIH dans les sous-populations lymphocytaires                     | x               |    |     |     |     | x   |
| Marqueurs de l'activation immunitaire (IP-10, IL-6, CD163s et CD14s) | x               |    |     |     |     | x   |

## ***F. Analyses statistiques***

### **1. Description des méthodes statistiques utilisées**

L'objectif principal est d'observer une baisse d'ADN-VIH total entre la première visite (J0) et la dernière visite (S48), il s'agit du critère de jugement principal exprimé en  $\log_{10}$  du nombre de copies d'ADN-VIH par million de CMSP. L'analyse principale est effectuée sur une population *per protocol*. Ceci est justifié par le fait que des participants débutant un traitement pas DTG peuvent changer de traitement pour différentes raisons médicales.

L'analyse des données utilise les statistiques bayésiennes. Un modèle de régression linéaire mixte sur l'ADN-VIH est appliqué avec un effet aléatoire sur les sujets et le centre. Diverses

variables explicatives sont le temps et le groupe d'inclusion en prenant en compte les interactions sont recherchées.

On suppose que la loi de distribution de l'ADN-VIH suit une loi Normale de paramètres  $\mu$  (la moyenne) et  $\tau$  (la précision). Les paramètres de la loi *a priori* sur  $\mu$  et  $\tau$  sont choisis peu informatifs tels que  $\mu$  suit une loi  $N(0,0.01)$  et  $\tau$  suit une loi  $\Gamma(0.005,0.05)$ . L'outil JAGS implémenté dans le logiciel R version 3.1.1 (*R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria*) en utilisant le package *rjags* a permis d'effectuer les simulations. L'analyse utilise 150.000 itérations des chaînes de Markov Monte Carlo (MCMC) avec un burn-in des 5000 premières simulations pour l'estimation de la distribution de l'ADN-VIH. La loi de distribution *a posteriori* permet de comparer des différents temps au sein d'un même groupe de participants et entre groupes pour un même temps de prélèvement.

## 2. Nombre de personnes à inclure et justification

Le calcul du nombre de sujets nécessaires a été réalisé à l'aide de simulations de test de Wilcoxon apparié unilatéral avec le logiciel R version 3.1.1 avec un risque de première espèce à 5% et une puissance de 80%. Pour fixer les paramètres de la simulation, nous avons émis des hypothèses qui nous paraissaient raisonnable au vue de la littérature [Koelsh *et al.* 2011, Lam *et al.* 2012] et de données disponibles de l'étude Flash ADN [Cuzin *et al.* 2015] pour des personnes traitées par d'autres traitements.

A partir du nombre de sujets nécessaires pour les analyses, une estimation du nombre de participants à inclure a été réalisée. Environ 10% de personnes ne suivant pas le protocole complet et qui ne pourront donc pas être incluses dans l'analyse *per protocol* et 10% de perdues de vue sont prises en compte.

Le nombre de sujets à inclure a donc été calculé (Tableau 11), cependant celui-ci semble dépasser les capacités de recrutement des différents centres pour le groupe VF, un arrêt de l'étude à l'atteinte des effectifs dans les autres groupes a donc été effectué. Un ensemble de 169 individus inclus et ayant eu au moins une mesure à J0 et S48 de l'ADN-VIH a donc été analysé pour le critère de jugement principal.

**TABLEAU 11 : ESTIMATION DU NOMBRE DE PERSONNES A INCLURE**

| Analyse  | Groupe    |           |            |           |
|--|-----------|-----------|------------|-----------|
|  | AI        | CI        | VS         | VF        |
| Sujets nécessaires pour l'analyse principale en <i>per protocol</i>            | 9         | 17        | 85         | 57        |
| Estimation du nombre de participants ne suivant pas le protocole complet (10%) | 1         | 2         | 8          | 6         |
| Estimation du nombre de perdus de vue (10%)                                    | 1         | 2         | 8          | 6         |
| Nombre total de personnes à inclure  | 11        | 21        | 101        | 69        |
| <b>Nombre de personnes analysables en <i>per protocol</i></b>                  | <b>20</b> | <b>21</b> | <b>116</b> | <b>12</b> |

## Article I

### **HIV-DNA AND IMMUNE ACTIVATION MARKERS ARE REDUCED IN VIREMIC BUT NOT IN AVIREMIC INDIVIDUALS STARTING A SUCCESSFUL DOLUTEGRAVIR-BASED REGIMEN**

**GANTNER Pierre**, PARTISANI Marialuisa, BECK-WIRTH Geneviève, FALLER Jean-Pierre, MARTINOT Martin, MOSHANI-ZADEH Mahsa, CHENEAU Christine, BATARD Marie-Laure, FISCHER Patricia, FUCHS Anne, REY David, FAFI-KREMER Samira.

Article en relecture

Poster présenté à : International Workshop on HIV persistence during therapy. 12-15 décembre, 2017, Miami, FL. Abstract PP 4.23.

**ADN VIH total et marqueurs inflammatoires sont réduits après l'initiation d'un traitement comprenant du dolutegravir mais chez des personnes virémiques mais pas lors d'un switch chez des personnes avirémiques.**

**A. Objectifs de l'analyse**

L'objectif de notre étude est d'analyser la quantité d'ADN-VIH sur sang total et des marqueurs inflammatoires de personnes vivant avec le VIH initiant un traitement par DTG à différents stades cliniques et thérapeutiques. Nous avons analysé de façon longitudinale les prélèvements de 169 individus inclus dans les quatre groupes de l'étude DRONE : les personnes en infection aiguë ou primo-infection (AI, n=20), les personnes en infection chronique (CI, n=21), les personnes traitées en succès virologique (VS, n=116) et les personnes traitées en échec virologique (VF, n=12), à J0, S4, S12, S24, S36 et S48 de l'initiation du DTG. L'ADN-VIH total a été quantifié par PCR bipleur ciblant le LTR du VIH et le gène de l'albumine humaine [Avettand-Fenoel *et al.* 2009]. Les différents marqueurs inflammatoires (IL-6us, IP-10, CD14s et CD163s) ont été quantifiés par ELISA à J0 et S48.

**B. Principaux résultats**

A J0 les niveaux d'ADN-VIH étaient les plus élevés dans le groupe AI par comparaison aux groupes CI, VS et VF (Figure 29). Inversement, à S48, le niveau d'ADN-VIH était le plus bas chez les participants du groupe AI par comparaison aux groupes CI, VS et VF (Figure 29). Le niveau d'ADN-VIH a diminué à S48 du traitement comprenant du DTG chez les participants du groupe AI (diminution médiane:  $-1.31 \log_{10}$  copies/million de CMSP), du groupe CI ( $-0.61$ ) et du groupe VF ( $-0.5$ ), mais pas chez ceux du groupe VS ( $\pm 0.0$ ), avec une probabilité de décroissance d'une intensité supérieure à  $0.5 \log_{10}$  copies/million de CMSP de 100%, 93%, 47% et 0%, respectivement (Figure 29). La décroissance de l'ADN-VIH observée dans les groupes AI, CI et VF est la plus rapide dans les trois premiers mois de traitement par DTG avec une décroissance médiane de  $-0.97$  (IQR,  $-1.31$ - $(-0.62)$ ),  $-0.34$  (IQR,  $-0.52$ - $(-0.14)$ ) et  $-0.40$  (IQR,  $-0.69$ - $(-0.16)$ )  $\log_{10}$  copies/million de CMSP, respectivement (Figure 30). Le pourcentage de participants ayant un ADN-VIH inférieur à la limite de détection à S48 était

de 35% dans le groupe AI, 16% dans le groupe CI, 4% dans le groupe VS et 0% dans le groupe VF.

Les marqueurs d'activation immunitaire ; CD14s, CD163s, IL-6us et IP-10 ont diminué à S48 de traitement par DTG chez les participants virémiques à J0 (groupes AI, CI et VF). Chez les participants du groupe VF, seule la quantité de CD14s a diminuée à S48 du switch. A S48 les niveaux d'IP-10, IL-6us et CD163s (mais pas ceux de CD14s) étaient corrélés aux niveaux d'ADN-VIH.

### ***C. Discussion***

Connaître la dynamique des réservoirs VIH sous traitement antirétroviral, notamment pour ceux incluant les nouveaux II, est primordial pour l'évaluation des futures stratégies curatives. Grâce à notre cohorte de personnes débutant un traitement par DTG dans différents contextes, nous avons démontré que la dynamique de l'ADN-VIH dépend du stade clinique et thérapeutique à l'initiation de celui-ci.

La mesure de l'ADN-VIH total a montré une diminution des niveaux d'ADN entre J0 et S48 dans tous les groupes d'inclusion (primo-infections, infections chroniques et échecs virologiques) sauf pour les personnes ayant switché en charge virale indétectable pour un traitement comprenant du DTG. Sur un suivi d'une durée d'un an, on peut donc conclure qu'un switch vers DTG n'impacte pas les niveaux de réservoir évalués par la mesure de l'ADN-VIH. Pour la première fois, une étude objective l'efficacité d'un traitement par DTG en termes de réduction du réservoir viral chez des personnes en primo-infection. Cette baisse du niveau d'ADN-VIH en primo-infection ( $-1.31 \log_{10}$  copies/million de CMSP à S48) est comparable voire plus importante que celle observée dans d'autres études comme l'étude OPTIPRIM ( $-1.24 \log_{10}$ ) [Chéret *et al.* 2015] et la cohorte PRIMO ( $-1.00 \log_{10}$ ) [Laanani *et al.* 2015]. Cette tendance est à vérifier sur des études à plus long suivi. De plus, nous montrons également qu'un traitement par DTG permet d'abaisser rapidement les niveaux de réservoir chez des personnes traitées à l'occasion d'un échec virologique. Les niveaux d'ADN-VIH les plus bas à S48 sont obtenus en traitant précocement, ce qui renforce la nécessité d'un traitement rapide dans un objectif futur de guérison [Ananworanich *et al.* 2016].

Par ailleurs, nous avons montré une baisse des marqueurs inflammatoires chez les personnes virémiques initiant un traitement par DTG. Là encore, les personnes initiant un traitement en



primo-infection bénéficiaient le plus de cette réduction de l'activation immunitaire.

Cependant chez les personnes avirémiques à J0, seules les niveaux de CD14s, un marqueur d'activation monocyttaire en réponse au LPS [Sandler *et al.* 2011], ont été diminués. Récemment, l'étude STRIVING incluant également des personnes débutant en switch un traitement comprenant du DTG a montré un déclin significatif des niveaux de CD14s et i-FABP [Lake *et al.* 2016]. Ensemble, ces résultats sont en faveur d'un effet possible du DTG sur le niveau d'inflammation, qui pourrait être dû à l'amélioration de l'intégrité de la barrière intestinale

En conclusion, un traitement par DTG initié en primo-infection, en infection chronique ou en cas d'échec virologique a montré un effet bénéfique sur le réservoir VIH et l'activation immunitaire. De façon intéressante, un traitement comprenant du DTG initié en succès virologique pourrait améliorer le profil d'activation immunitaire résiduelle. Les futures études de stratégies curatives pourraient également étudier l'intérêt d'un traitement comprenant du DTG.

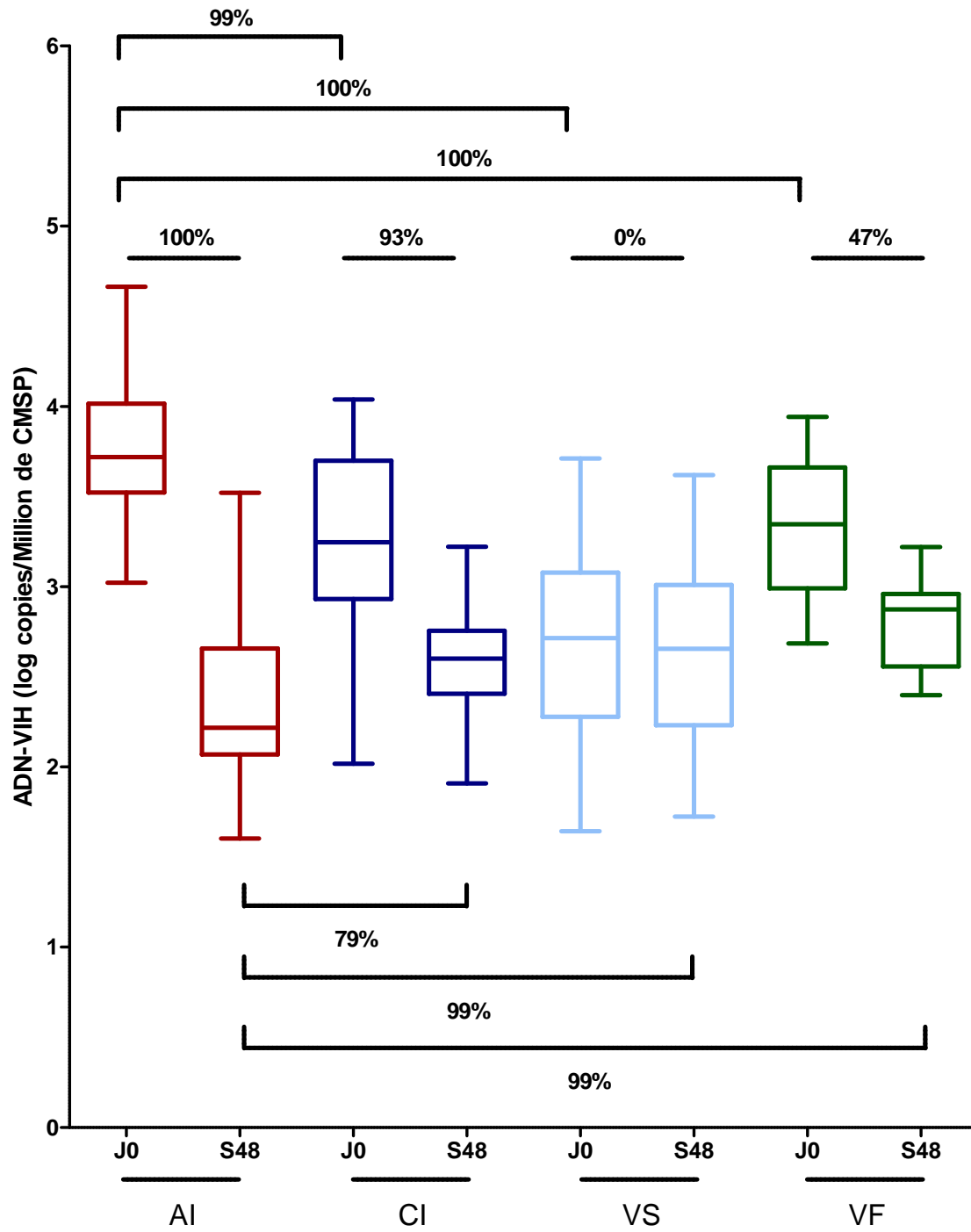


Figure 29. Comparatif des niveaux d'ADN-VIH entre J0 et S48 des quatre groupes d'inclusion.

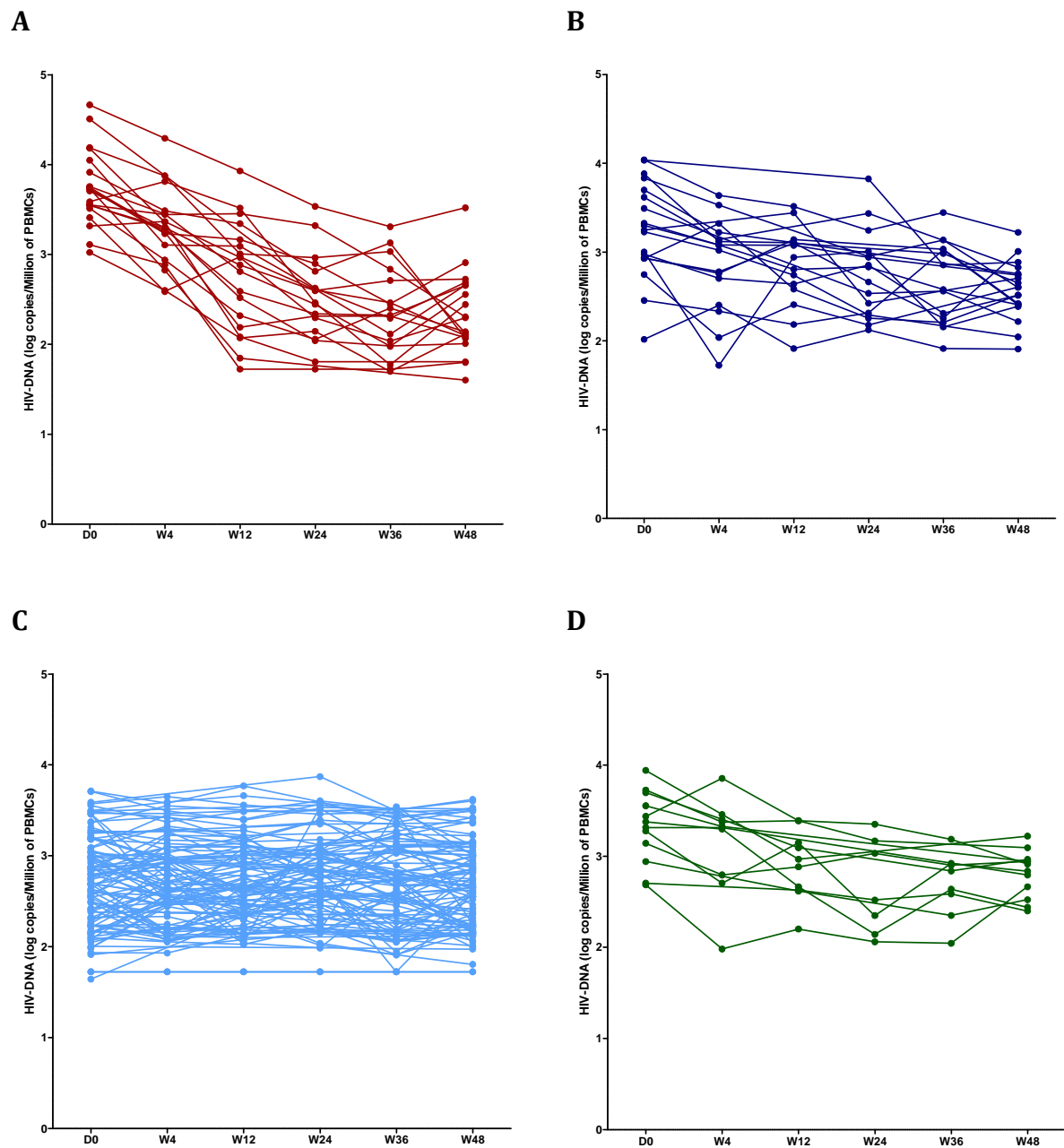


Figure 30. Dynamique des niveaux d'ADN-VIH entre J0 et S48 dans les quatre groupes d'inclusion.

L'ADN-VIH est représenté en fonction du groupe : (A) AI, (B) CI, (C) VS et (D) VF.

**HIV-DNA AND IMMUNE ACTIVATION MARKERS ARE REDUCED IN VIREMIC BUT NOT IN AVIREMIC INDIVIDUALS STARTING A SUCCESSFUL DOLUTEGRAVIR-BASED REGIMEN**

**GANTNER Pierre**<sup>1,2</sup>, **PARTISANI Marialuisa**<sup>3</sup>, **BECK-WIRTH Geneviève**<sup>4</sup>, **FALLER Jean-Pierre**<sup>5</sup>, **MARTINOT Martin**<sup>6</sup>, **MOSHENI-ZADEH Mahsa**<sup>6</sup>, **CHENEAU Christine**<sup>3</sup>, **BATARD Marie-Laure**<sup>3</sup>, **FISCHER Patricia**<sup>3</sup>, **FUCHS Anne**<sup>1</sup>, **REY David**<sup>3</sup>, **FAFI-KREMER Samira**<sup>1,2</sup>.

1 Virology Laboratory, Strasbourg University Hospitals, Strasbourg, France.

2 Strasbourg University, INSERM, UMR-S 1109, F-67000 Strasbourg, France.

3 Le Trait d'Union, HIV-infection care center, Strasbourg University Hospitals, Strasbourg, France.

4 Internal Medicine Department, HIV-infection care center, GHR- Mulhouse Sud Alsace, Mulhouse, France.

5 Department of Infectious Diseases, Hôpital Nord Franche Comté, Belfort, France.

6 Internal Medicine and Rheumatology Department, Hôpital Civil de Colmar, Colmar, France.

\* Corresponding author:

Prof. Samira Fafi-Kremer

Institut de Virologie

3 rue Koeberlé

67000 Strasbourg, France

Tel: + 33 3 69 55 14 38

Fax: + 33 3 68 85 37 50

Email: samira.fafi-kremer@unistra.fr

## Abstract

**Background:** Strategies aimed at reducing the latent reservoir size and/or boosting host immune responses, including combined antiretroviral therapy (cART), may enhance the probability of a possible cure. Due to its unique resistance profile, it was argued that the integrase inhibitor dolutegravir could be part of such strategies. However, whether dolutegravir impacts HIV reservoir in different clinical settings is still unknown. Here, we assessed the dynamics of HIV reservoir and immune activation markers among HIV-infected adults initiating a dolutegravir-based regimen (DBR) at different stage of HIV infection.

**Methods:** The DRONE study was a multicenter prospective study enrolling individuals starting a DBR and followed-up during 48 weeks (W48) (NCT02557997). Responders to DBR were analyzed for longitudinal total HIV-DNA in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) and serum immune activation biomarkers (sCD14, sCD163, IL-6us and IP-10) measurements. Bayesian modeling was used to estimate the distribution of HIV-DNA levels.

**Results:** Among 202 enrolled individuals, 169 achieved or maintained virological control on DBR and therefore could be analyzed for primary objective. According to clinical stage of HIV infection, participants were allocated to different groups: acute infections (AI, n=20), ART-naïve chronic infections (CI, n=21), individuals in virological success on cART (VS, n=116), and in the aftermath of virological failures at baseline (VF, n=12). Participants, mostly male (73%) had a median age of 48 years. Using Bayesian mixed linear modeling, HIV-DNA decreased at W48 of DBR in the AI group (median decrease:  $-1.3 \log_{10}$  copies/ $10^6$  PBMCs), the CI group ( $-0.6$ ) and the VF group ( $-0.5$ ), but not in the VS group ( $\pm 0.0$ ), with a probability of achieving a clinically relevant decrease  $> 0.5 \log_{10}$  copies/ $10^6$  PBMCs of 1.00, 0.93, 0.47 and 0.00, respectively. HIV-DNA and immune activation levels were correlated. Activation biomarkers decreased on DBR for individuals with ongoing HIV replication at baseline (AI, CI and VF groups) but not for aviremic individuals (VS group).

**Conclusions:** Successful DBR produced a rapid HIV-DNA decline in ART-naïve but also in ART-failing individuals. Though, dolutegravir failed at reducing HIV reservoir levels when introduced as a switching regimen. More studies on the effect of dolutegravir on viral latency are needed.

**Keywords:** Integrase Inhibitor, Viral reservoir, HIV-DNA, Inflammation, Acute infection.

## Introduction

One of the remaining challenges of HIV infection is to identify an efficacious curative strategy. The main barrier to the eradication of the virus is related to the persistence of latent HIV reservoirs [Siliciano *et al.* 2016]. Strategies aimed at reducing the latent reservoir size and/or boosting host immune responses, associated with combined antiretroviral therapy (cART), may enhance the probability of a possible cure [Barouch *et al.* 2014; Simonetti *et al.* 2015]. Due to its unique resistance profile, it was argued that the integrase inhibitor dolutegravir could be part of such strategies [Wainberg *et al.* 2016; Pham *et al.* 2018]. Dolutegravir has proven both efficacy and safety in numerous clinical trials including participants in various clinical conditions [Raffi *et al.* 2013; Cahn *et al.* 2013; Castagna *et al.* 2014; Akil *et al.* 2015; Walmsley *et al.* 2015; Molina *et al.* 2015; Orrell *et al.* 2017; Trottier *et al.* 2017]. However, whether dolutegravir impacts HIV reservoir in these different clinical settings, such as when initiated in acute infection, is still unknown [Narang *et al.* 2014]. Indeed, early cART initiation showed promising results in achieving viral control upon cART cessation in some individuals [Saez-Cirion *et al.* 2013; Robb *et al.* 2016]. Thus, a more detailed understanding of the HIV reservoir size during dolutegravir-based cART according to the clinical context is needed.

The DRONE trial (impact of a **D**olutegravir-based regimen on **R**eservoirs **O**f treatment-**N**aïve and **-E**xperienced individuals) was designed to determine whether a dolutegravir-based regimen (DBR) influences the size of HIV reservoir, as approximated by total HIV-DNA measurements. Especially, it allows HIV reservoir size comparison according to the clinical context of DBR initiation. Indeed, cART-naïve in acute or chronic infection, or cART-experienced individuals who started DBR while in virological success or in the aftermath of virological failure were enrolled in four distinct study groups. The objective of this study is to depict HIV reservoir dynamics during a 48 weeks follow-up in successfully treated on dolutegravir-based cART individuals with different clinical profiles.

## Methods

### *Study population and study design*

DRONE was a prospective, open label study, conducted in 4 French centers and involving HIV-1 infected adults with different clinical profiles (Clinicaltrials.gov: NCT02557997). Recruitment of individuals starting a DBR occurred from February 2015 to October 2016 with a 48-weeks follow-up. All participants gave written informed consent. The study was reviewed and approved by both Independent Protection Committee East 4 and the French Safety Drug Agency (ANSM).

Participants were enrolled in one of the four groups of inclusion: treatment-naïve individuals who initiated treatment with a DBR during acute (AI) or chronic (CI) infection, and treatment-experienced individuals who started a DBR while in virological success (VS) or in the aftermath of virological failure (e.g. HIV-1 RNA > 50 copies/mL, VF).

cART-naïve participants were eligible for an inclusion in the AI group, if they initiated DBR at Fiebig stage V or less [Cohen *et al.* 2011; Goujard *et al.* 2006], or for an inclusion in the CI group, if they showed a complete HIV-1 western blot profile at baseline [Hocqueloux *et al.* 2013]. cART experienced individuals were included in the VS group if they were aviremic (e.g. HIV-1 RNA < 50 copies/mL) at baseline, whereas those from the VF group needed to be viremic on two consecutive measurements (e.g. HIV-1 RNA > 50 copies/mL at baseline and on the last available sample) for enrollment.

The main non-inclusion criteria were pregnancy/breastfeeding, HIV-2 infection, ongoing AIDS disease, and grade 4 biological abnormalities.

Participants had to achieve virological control as soon as week 24 of DBR for participants from the AI, CI and VF groups or remain controlled after switching to DBR during follow-up for those from the VS group, to be considered for primary objective measurements. Thus, for analyzing the reservoir size dynamic on successful DBR, participants who experienced virological failure, withdrew dolutegravir, stopped the study or were lost to follow-up before the end of the study protocol (week 48) were excluded.

### *Procedures*

Clinical examinations and laboratory analysis were performed at inclusion at 4, 12, 24, 36 and 48 weeks. HIV-RNA, CD4+ and CD8+ T cell counts, blood cells count and biochemical values were determined locally at each site. Total cell-associated HIV-DNA and immune

activation markers were centralized. HIV-DNA was quantified by LTR real-time PCR assay with the Generic HIV DNA CELL assay (Biocentric, Bandol, France) from whole blood samples collected at each visit [Avettand-Fenoel *et al.* 2009]. Results are reported as the number of HIV-DNA copies per million of peripheral blood mononuclear cells (PBMCs). Immune activation markers were assessed by ELISA techniques with the: Human soluble CD163 kit (Cusabio, Kampenhout, Belgium), Human sCD14 Quantikine kit (R&D, Minneapolis, MN), Human IP-10 Quantikine kit (R&D, Minneapolis, MN) and Human IL-6 High Sensitivity ELISA kit (eBioscience, Vienna, Austria)

The primary endpoint was the difference between baseline and week 48 (W48) in HIV-DNA levels in each participant group. Other pre-specified endpoints included the comparison of HIV-DNA levels at each time point between groups, and the percentage of individuals with HIV-DNA levels below the detection limit of 5 copies/PCR [Avettand-Fenoel *et al.* 2009]. Two major secondary endpoints were the difference between baseline and W48 in inflammation biomarkers levels in each participant group and the comparison of inflammation biomarkers levels at each time point between groups.

#### *Sample size*

Using data from Koelsch *et al.* and Cuzin *et al.* we calculated that we would need to enroll 11, 21, 101 and 69 individuals to detect a difference of at least 0.5 log<sub>10</sub> copies/million of PBMCs between baseline and W48, in the AI, CI, VS and VF groups, respectively [Koelsch *et al.* 2011; Cuzin *et al.* 2015]. A total of 202 had to be included in the study. The subject number calculation was performed by a paired Wilcoxon one-sided test with a 80% power and a 5% level of significance. As regarding to our active file population, including 69 cART-failing individuals could not be feasible in a reasonable amount of time; the study was arrested once the target numbers in the other groups of individuals were obtained.

#### *Statistical methods*

All variables (HIV-DNA, Neopterine, sCD163, sCD14, IP-10 and IL-6us) were addressed in a *per protocol* analysis for all participants achieving and maintaining virological suppression through W48 as defined earlier. Demographic and clinical characteristics were summarized within each group of inclusion as median and interquartile range (IQR) for continuous variables and frequency and percentage for categorical variables.



We used a Bayesian approach to compare HIV-DNA and immune activation markers levels changes over follow-up assuming that these biological followed a normal distribution  $N(\mu, \sigma^2)$ . *Posterior* distribution parameter estimates were derived in a mixed linear model using program JAGS within the rjags package in R version 3.1.1 (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria). They were generated using Markov-chain Monte Carlo chains with 150,000 iterations and a 5,000 first ones burning. With no previous reservoir data set on DBR available, uninformative *prior* probabilities were used: the coefficients on  $\mu$  were  $N(0, 0.01)$  and on  $1/\sigma^2$  were  $\Gamma(0.05, 0.05)$  [Gaudet *et al.* 2017]. For the primary objectives, comparisons between two time points or two groups are expressed as the probability of observing a difference in HIV-DNA levels greater than  $0.5 \log_{10}$  copies/million of PBMCs, which was found to be a virologically relevant threshold [Gantner *et al.* 2017].

## Results

A total of 202 individuals were enrolled in the DRONE trial, of whom 169 achieved or maintained virological control on DBR and therefore could be analyzed for primary objective. Participants were allocated to the different study groups according to clinical conditions: 20 individuals in the AI group, 21 individuals in the CI group, 116 individuals in the VS group and 12 individuals in the VF group.

### *Baseline characteristics*

Participants were primarily male (73%), with a median age of 48 years (IQR, 31-59) (Table 1). Sixty-three percent were men who have sex with men and 69% of individuals harbored HIV-1 subtype B. Of note, individuals in AI group mostly initiated DBR at Fiebig stage V (75%) and individuals in the VS group underwent a median of 7 years (IQR, 2-10) of suppressive ART. Associated backbones were mostly TDF/FTC for the AI group (100%) and ABC/3TC for the CI, VS and VF groups (81%, 72 and 75%).

### *Changes in HIV-DNA levels*

At baseline HIV-DNA levels were the highest in the AI group (Table 1), with an estimated Bayesian probability of being higher than HIV-DNA levels in the CI, VS and VF group of 100%, 100% and 99% respectively (Figure 1). Conversely, at W48 HIV-DNA levels were the lowest in the AI group (Table 2), with a probability of being lower than HIV-DNA levels in the CI, VS and VF group of 79%, 99% and 100% respectively (Figure 1). HIV-DNA decreased at W48 of DBR in the AI group (median decrease:  $-1.31 \log_{10}$  copies/million of PBMCs), the CI group ( $-0.61$ ) and the VF group ( $-0.5$ ), but not in the VS group ( $\pm 0.0$ ), with a probability of achieving a clinically relevant decrease  $> 0.5 \log_{10}$  copies/ $10^6$  PBMCs of 100%, 93%, 47% and 0%, respectively (Figure 2). The largest decrease observed in the AI, CI and VF groups occurred during the first three months as of  $-0.97$  (IQR,  $-1.31$ - $(-0.62)$ ),  $-0.34$  (IQR,  $-0.52$ - $(-0.14)$ ) and  $-0.40$  (IQR,  $-0.69$ - $(-0.16)$ )  $\log_{10}$  copies/ $10^6$  PBMCs, respectively (Figure 3). The percentage of participants with HIV-DNA below the limit of detection at W48 was of 35% in the AI group, 16% in the CI group, 4% in the VS group and 0% in the VF group (Table 2).

### *Changes in immune activation markers levels*

All activation biomarkers; sCD14, sCD163, IL-6 and IP-10 decreased at W48 of DBR for individuals with ongoing HIV replication at baseline with: -18%, -49%, -51% and -76% fold reduction in the AI group, -13%, -40%, -40% and -36% fold reduction in the CI group and -6%, -32%, -30% and -30% VF group, respectively (Figure 4). This was not the case for aviremic individuals at baseline from VS group for which only a sCD14 decrease of -9% fold reduction was observed. Under virological suppression at W48 IP-10, IL-6 and sCD163 were correlated to HIV-DNA levels but not sCD14 (Figure 5).

## Discussion

Understanding the dynamics of HIV reservoirs under cART, especially for those including recently approved integrase inhibitors is important for evaluating the efficacy of future interventions aimed at curing HIV infection. Using, a large cohort of Dolutegravir-including cART-treated individuals initiated in different clinical settings, we showed that HIV-DNA dynamics in blood strongly depended on the clinical and therapeutic stages of HIV infection at DBR initiation.

Our key finding is that when participants were viremic at baseline (AI, CI, and VF groups), a dolutegravir-based cART decreased the HIV-DNA levels. Raltegravir, the first approved integrase inhibitor has shown abilities to reduce HIV reservoirs in cART-naïve [Koelsch *et al.* 2011]. So does dolutegravir, when initiated in acute or chronic infection, but also when initiated in cART-failing individuals. HIV-DNA decrease at W48 on DBR when initiated in primary infection ( $-1.31 \log_{10}$  copies/million of PBMCs) was similar with a previous reports using the same qPCR technique from the PRIMO cohort ( $-1.00 \log_{10}$ ) [Laanani *et al.* 2015] or a three drug-containing regimen in the OPTIPRIM study ( $-1.24 \log_{10}$ ) [Chéret *et al.* 2015]. If there is a trend toward a dolutegravir superiority compared to the other drugs in term of HIV-DNA reduction, it has to be confirmed on long term follow-up.

Although raltegravir cART-controlled individuals showed a positive impact on HIV reservoir as an intensification strategy [Vallejo *et al.* 2012 ; Buzon *et al.* 2010] it failed at reducing HIV reservoir markers as a switching regimen [Delaugerre *et al.*, 2010 ; Lam *et al.* 2012]. Dolutegravir also failed at reducing HIV-DNA levels, however, we recently showed that it could impact archived HIV quasispecies genetics [Gantner et al 2018A] and their distribution to the different CD4+ T cell subsets [Gantner et al 2018B].

Besides, measuring different immune activation biomarkers used in previous reports [Rajasuriar *et al.* 2015], we showed a relevant decline in these markers when DBR was initiated in viremia individuals from the AI, CI and VF groups. Acutely-treated individuals experienced the most critical decline magnitude in these markers at W48. Together, both HIV-DNA and immune activation markers dynamics strongly support the view that early cART might limit the size of viral reservoirs, HIV pathogenesis and improve the prospects for a functional HIV cure.

However and conversely to previous reports on raltegravir-containing switching strategies, switching to a DBR only impact sCD14 levels, a marker of monocyte response to LPS, but not sCD163, IL-6us or IP-10 levels [Martinez *et al.* 2012 ; Gupta *et al.* 2013 ; Lake *et al.* 2014 ; Silva *et al.* 2013]. Recently, the STRIIVING study also investigated the impact of switching to a dolutegravir-containing cART and found a significant decrease in both sCD14 and i-FABP levels [Lake *et al.*; 2016]. Altogether, our results suggest that dolutegravir could impact inflammation, and might play a role in improving gastrointestinal barrier integrity [Sandler *et al.* 2011].

Our study has several limitations, including a small number of participants in some study groups. Though the number of participants is limited, it was sufficient to achieve statistically relevant conclusions. Moreover, our well-characterized cohort reflects different clinical and therapeutic stages of HIV infection, but does not allow comparison with other cART regimens. Indeed, whether our observations hold true when other classes of drugs are used needs to be investigated.

In conclusion, our study showed that a dolutegravir-based treatment reduced the HIV-DNA burden in all viremic individuals, which differed between clinical and therapeutic stages of HIV infection at dolutegravir initiation. Early treated participants experienced the most dramatic decrease in HIV-DNA levels. Interestingly, immune activation seemed to be impacted by dolutegravir, even when used as a switching strategy. Cure strategies aimed at reducing the latent reservoir size and/or boosting host immune responses, should be further tested in association with dolutegravir-containing cART.

## **Acknowledgements**

We would like to thank Stéphanie Bertsch and Frédéric Jegou for technical assistance.

The results were presented at: International Workshop on HIV persistence during therapy. 12-15 décembre, 2017, Miami, FL. Abstract PP 4.23.

## **Funding**

This study was funded by our institution, the University Hospital of Strasbourg (registration number, PRI-HUS #2014-5073) and the Institut de Médecine et d'Epidémiologie Appliquée (IMEA).

## **Transparency declarations**

None to declare.

## References

Akil B, Blick G, Hagins DP, *et al.* Dolutegravir versus placebo in subjects harbouring HIV-1 with integrase inhibitor resistance associated substitutions: 48-week results from VIKING-4, a randomized study. *Antivir Ther.* 2015;20(3):343-8.

Barouch DH, Deeks SG. Immunologic strategies for HIV-1 remission and eradication. *Science.* 2014 Jul 11;345(6193):169-74.

Buzón MJ, Massanella M, Llibre JM, *et al.* HIV-1 replication and immune dynamics are affected by raltegravir intensification of HAART-suppressed subjects. *Nat Med.* 2010 Apr;16(4):460-5.

Cahn P, Pozniak AL, Mingrone H, *et al.* Dolutegravir versus raltegravir in antiretroviral-experienced, integrase-inhibitor-naive adults with HIV: week 48 results from the randomised, double-blind, non-inferiority SAILING study. *Lancet* 2013; 382: 700-8.

Castagna A, Maggiolo F, Penco G *et al.* Dolutegravir in antiretroviral-experienced patients with raltegravir- and/or elvitegravir-resistant HIV-1: 24-week results of the phase III VIKING-3 study. *J Infect Dis.* 2014 Aug 1;210(3):354-62.

Chéret A, Nembot G, Mélard A, *et al.* Intensive five-drug antiretroviral therapy regimen versus standard triple-drug therapy during primary HIV-1 infection (OPTIPRIM-ANRS 147): a randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet Infect Dis.* 2015 Apr;15(4):387-96.

Cohen MS, Shaw GM, McMichael AJ, *et al.* Acute HIV-1 Infection. *N Engl J Med.* 2011 May 19;364(20):1943-54.

Cuzin L, Pugliese P, Sauné K, *et al.* Levels of intracellular HIV-DNA in patients with suppressive antiretroviral therapy. *AIDS.* 2015 Aug 24;29(13):1665-71.

Delaugerre C, Charreau I, Braun J, *et al.* Time course of total HIV-1 DNA and 2-long-terminal repeat circles in patients with controlled plasma viremia switching to a raltegravir-containing regimen. *AIDS*. 2010 Sep 24;24(15):2391-5.

Gantner P, Mélard A, Damond F, *et al.* Interlaboratory quality control of total HIV-1 DNA load measurement for multicenter reservoir studies. *J Med Virol*. 2017 Nov;89(11):2047-2050.

Gantner P, Lee GQ, Rey D, *et al.* Dolutegravir reshapes the genetic diversity of HIV-1 reservoirs. *J Antimicrob Chemother*. 2018 Apr 1;73(4):1045-1053.

Gantner P, Barnig C, Partisani M, *et al.* Distribution and reduction magnitude of HIV-DNA burden in CD4+ T cell subsets depend on art initiation timing. *AIDS*. 2018 Apr 24;32(7):921-926.

Gaudet CE. Review of doing Bayesian data analysis: a tutorial with R, JAGS, and Stan (second edition). *Clin Neuropsychol*. 2017 Aug - Oct;31(6-7):1268-1270.

Goujard C, Bonarek M, Meyer L, *et al.* CD4 cell count and HIV DNA level are independent predictors of disease progression after primary HIV type 1 infection in untreated patients. *Clin Infect Dis*. 2006 Mar 1;42(5):709-15.

Gupta SK, Mi D, Moe SM, *et al.* Effects of switching from efavirenz to raltegravir on endothelial function, bone mineral metabolism, inflammation, and renal function: a randomized, controlled trial. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2013 Nov 1;64(3):279-83.

Hocqueloux L, Avettand-Fènoël V, Jacquot S, *et al.* Long-term antiretroviral therapy initiated during primary HIV-1 infection is key to achieving both low HIV reservoirs and normal T cell counts. *J Antimicrob Chemother*. 2013 May;68(5):1169-78.

Koelsch KK, Boesecke C, McBride K, *et al.* Impact of treatment with raltegravir during primary or chronic HIV infection on RNA decay characteristics and the HIV viral reservoir. *AIDS*. 2011; 25(17): 2069-78.



Laanani M, Ghosn J, Essat A, *et al.* Impact of the Timing of Initiation of Antiretroviral Therapy During Primary HIV-1 Infection on the Decay of Cell-Associated HIV-DNA. *Clin Infect Dis.* 2015 Jun 1;60(11):1715-21.

Lake JE, McComsey GA, Hulgand T, *et al.* Switch to raltegravir decreases soluble CD14 in virologically suppressed overweight women: the Women, Integrase and Fat Accumulation Trial. *HIV Med.* 2014 Aug;15(7):431-41

Lake J, Currier JS, Koteff J *et al.* Cardiovascular Biomarkers After Switch to ABC/DTG/3TC: The STRIVING Study. Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections. February 22–25, 2016, Boston, MA. Abstract 660.

Lam YM, McBride KL, Amin J, *et al.* Switching virally suppressed, treatment-experienced patients to a raltegravir-containing regimen does not alter levels of HIV-1 DNA. *PLoS One.* 2012; 7(3): e31990.

Martínez E, D'Albuquerque PM, Llibre JM, *et al.* Changes in cardiovascular biomarkers in HIV-infected patients switching from ritonavir-boosted protease inhibitors to raltegravir. *AIDS.* 2012 Nov 28;26(18):2315-26.

Molina JM, Clotet B, van Lunzen J, *et al.* Once-daily dolutegravir versus darunavir plus ritonavir for treatment-naïve adults with HIV-1 infection (FLAMINGO): 96 week results from a randomised, open-label, phase 3b study. *Lancet HIV.* 2015 Apr;2(4):e127-36

Narang BK, Grewal GK, Roy S, Bariwal J, Gupta MK, Rawal RK. A novel integrase targeting agent to explore the future prospective of HIV eradication: dolutegravir. *Curr HIV Res.* 2014;12(5):325-38.

Orrell C, Hagins DP, Belonosova E, *et al.* Fixed-dose combination dolutegravir, abacavir, and lamivudine versus ritonavir-boosted atazanavir plus tenofovir disoproxil fumarate and emtricitabine in previously untreated women with HIV-1 infection (ARIA): week 48 results

from a randomised, open-label, non-inferiority, phase 3b study. *Lancet HIV*. 2017 Dec;4(12):e536-e546.

Pham HT, Mesplède T. The latest evidence for possible HIV-1 curative strategies. *Drugs Context*. 2018 Feb 21;7:212522.

Raffi F, Jaeger H, Quiros-Roldan E, *et al*. Once-daily dolutegravir versus twice-daily raltegravir in antiretroviral-naïve adults with HIV-1 infection (SPRING-2 study): 96 week results from a randomised, double-blind, non-inferiority trial. *Lancet Infect Dis* 2013; 13: 927-35.

Rajasuriar R, Wright E, Lewin SR. Impact of antiretroviral therapy (ART) timing on chronic immune activation/inflammation and end-organ damage. *Curr Opin HIV AIDS*. 2015 Jan;10(1):35-42.

Robb ML, Ananworanich J. Lessons from acute HIV infection. *Curr Opin HIV AIDS*. 2016 Nov;11(6):555-560.

Sáez-Ciri3n A, Bacchus C, Hocqueloux L, *et al*. Post-treatment HIV-1 controllers with a long-term virological remission after the interruption of early initiated antiretroviral therapy ANRS VISCONTI Study. *PLoS Pathog* 2013; 9: e1003211.

Sandler NG, Wand H, Roque A, *et al*. Plasma levels of soluble CD14 independently predict mortality in HIV infection. *J Infect Dis*. 2011 Mar 15;203(6):780-90.

Siliciano JD, Siliciano RF. Recent developments in the effort to cure HIV infection: going beyond N = 1. *J Clin Invest*. 2016 Feb;126(2):409-14.

Silva EF, Charreau I, Gourmel B, *et al*. Decreases in inflammatory and coagulation biomarkers levels in HIV-infected patients switching from enfuvirtide to raltegravir: ANRS 138 substudy. *J Infect Dis*. 2013 Sep;208(6):892-7.

Simonetti FR, Kearney MF. Review: Influence of ART on HIV genetics. *Curr Opin HIV AIDS*. 2015 Jan;10(1):49-54.

Trottier B, Lake JE, Logue K, *et al*. Dolutegravir/abacavir/lamivudine versus current ART in virally suppressed patients (STRIVING): a 48-week, randomized, non-inferiority, open-label, Phase IIIb study. *Antivir Ther*. 2017;22(4):295-305.

Vallejo A, Gutierrez C, Hernandez-Novoa B, *et al*. The effect of intensification with raltegravir on the HIV-1 reservoir of latently infected memory CD4 T cells in suppressed patients. *AIDS*. 2012; 26(15): 1885-94.

Wainberg MA, Han YS, Mesplède T. Might dolutegravir be part of a functional cure for HIV? *Can J Microbiol* 2016; 62: 375-82.

Walmsley S, Baumgarten A, Berenguer J, *et al*. Brief Report: Dolutegravir Plus Abacavir/Lamivudine for the Treatment of HIV-1 Infection in Antiretroviral Therapy-Naive Patients: Week 96 and Week 144 Results From the SINGLE Randomized Clinical Trial. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2015 Dec 15;70(5):515-9.

Table 1. Demographic and baseline characteristics

| <b>Group of inclusion</b>  | <b>AI group<br/>(n=20)</b> | <b>CI group<br/>(n=21)</b> | <b>VS group<br/>(n=116)</b> | <b>VF group<br/>(n=12)</b> |
|--|----------------------------|----------------------------|-----------------------------|----------------------------|
| Men (%)  | 18 (90%)                   | 15 (71%)                   | 81 (70%)                    | 9 (75%)                    |
| Median age (IQR)   | 34 (28-51)                 | 31 (24-56)                 | 52 (46-61)                  | 42 (36-44)                 |
| Median time between estimated date of infection and enrollment, days (IQR) | 47 (22-52)                 | 467 (225-682)              | NA                          | NA                         |
| Median CD4+ cell count, /mm <sup>3</sup> (IQR)                             | 623 (314-730)              | 441 (226-582)              | 697 (581-784)               | 313 (93-404)               |
| Median CD4+/CD8+ ratio (IQR)   | 0.41 (0.32-0.52)           | 0.24 (0.15-0.52)           | 0.83 (0.56-1.13)            | 0.71 (0.49-0.88)           |
| Median HIV-RNA, log <sub>10</sub> copies/mL (IQR)                          | 5.26 (4.43-5.75)           | 4.35 (4.10-5.31)           | 1.6 (1.6-1.6)               | 4.53 (3.23-4.95)           |
| Median time with HIV-RNA < 50 copies/mL, years (IQR)                       | NA                         | NA                         | 7 (2-10)                    | NA                         |
| Median HIV-DNA, log <sub>10</sub> copies/million of PBMCs (IQR)            | 3.73 (3.55-3.94)           | 3.32 (2.93-3.80)           | 2.80 (2.46-3.18)            | 3.35 (3.09-3.60)           |
| Participants with HIV-DNA below the detection limit (%)                    | 0                          | 0                          | 4 (4%)                      | 0                          |

\* IQR, Interquartile range; NA, Not Applicable.

Table 2. Outcomes at week 48

| <b>Group of inclusion</b>  | <b>AI group<br/>(n=20)</b> | <b>CI group<br/>(n=21)</b> | <b>VS group<br/>(n=116)</b> | <b>VF group<br/>(n=12)</b> |
|--|----------------------------|----------------------------|-----------------------------|----------------------------|
| Median HIV-DNA, log <sub>10</sub> copies/million of PBMCs (IQR)        | 2.50 (2.13-2.65)           | 2.66 (2.47-2.87)           | 2.74 (2.37-3.06)            | 2.89 (2.63-3.00)           |
| Median HIV-DNA change, log <sub>10</sub> copies/million of PBMCs (IQR) | -1.31 (-1.73-(-1.11))      | -0.61 (-0.92-(-0.44))      | -0.00 (-0.23-(+0.12))       | -0.48 (-0.72-(-0.33))      |
| Participants with HIV-DNA below the detection limit (%)                | 7 (35%)                    | 3 (16%)                    | 7 (6%)                      | 0                          |

Figure 1. Raw HIV-DNA dynamic over follow-up

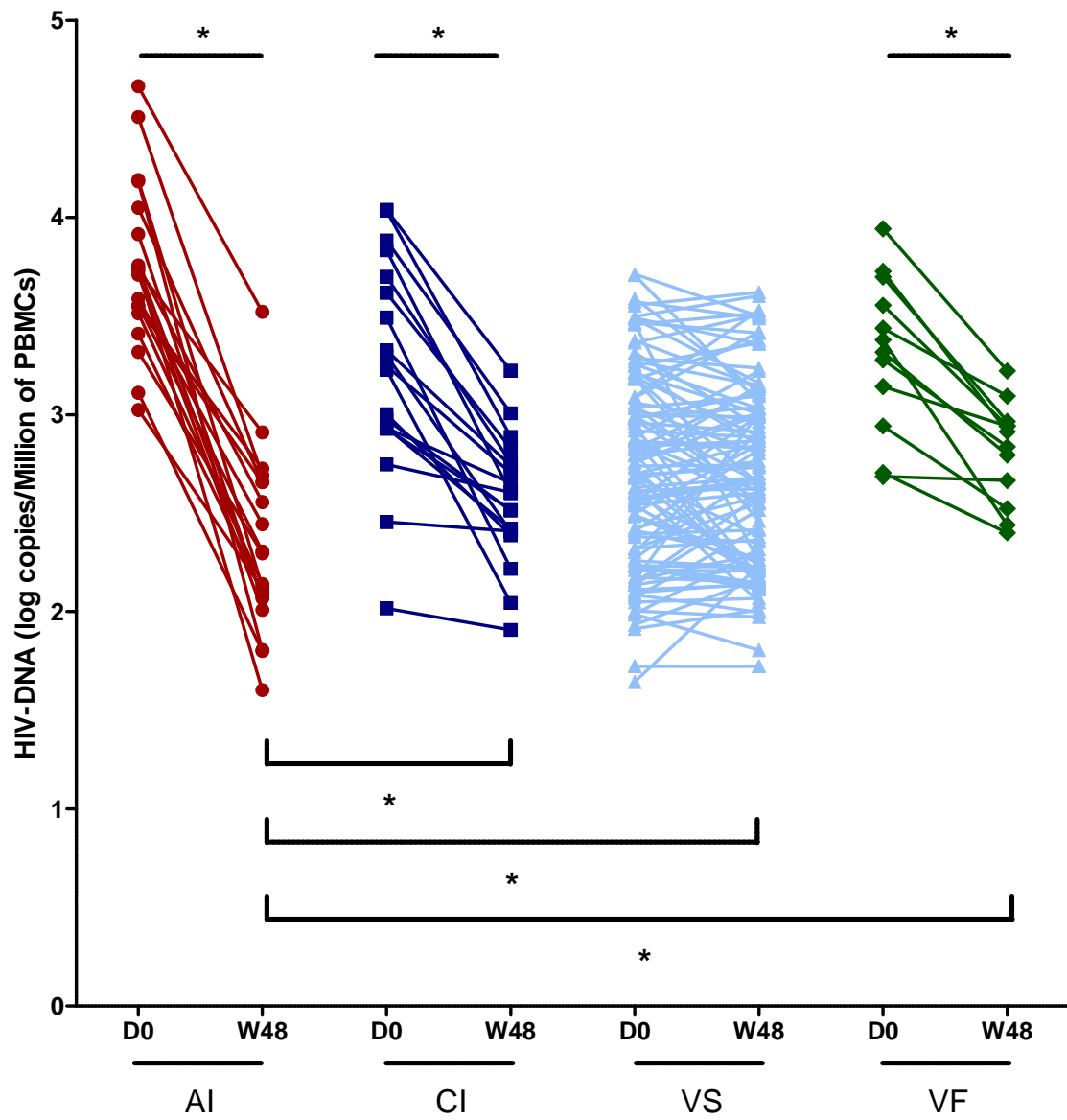


Figure 2. Bayesian modeling of HIV-DNA levels dynamic

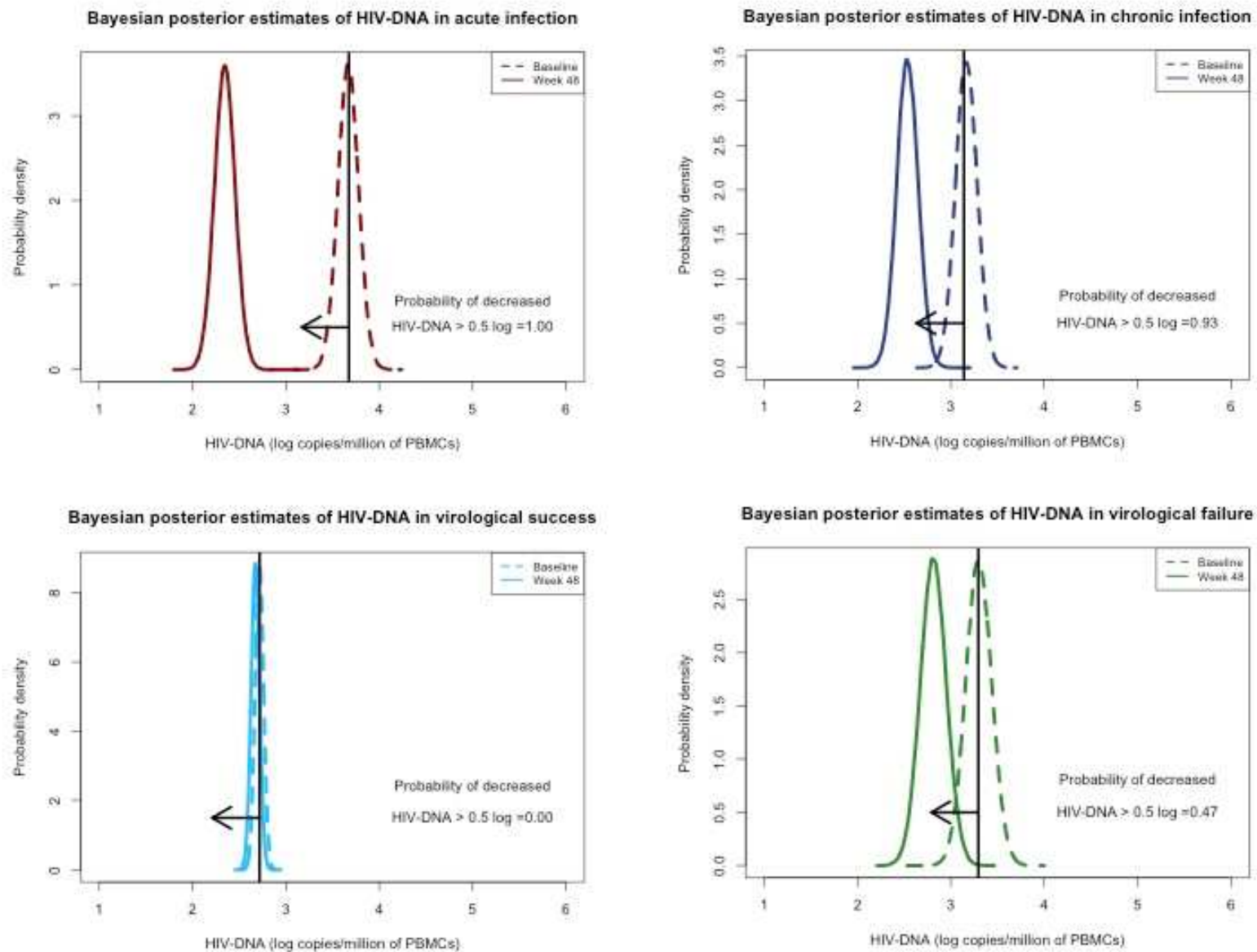


Figure 3. Longitudinal HIV-DNA over follow-up with median, IQR and range values.

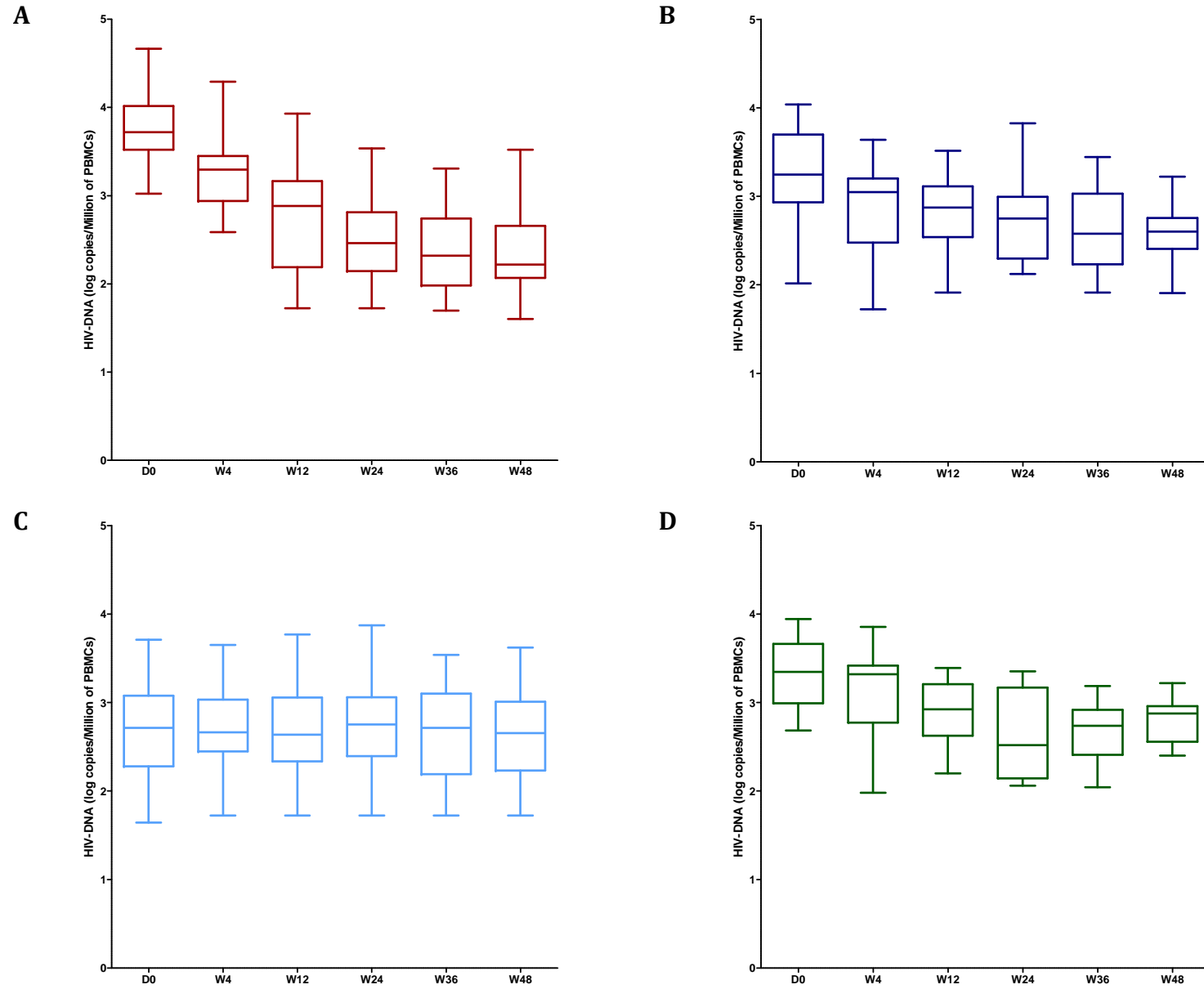


Figure 4. Changes of HIV-DNA and immune activation markers levels at W48 as percentages

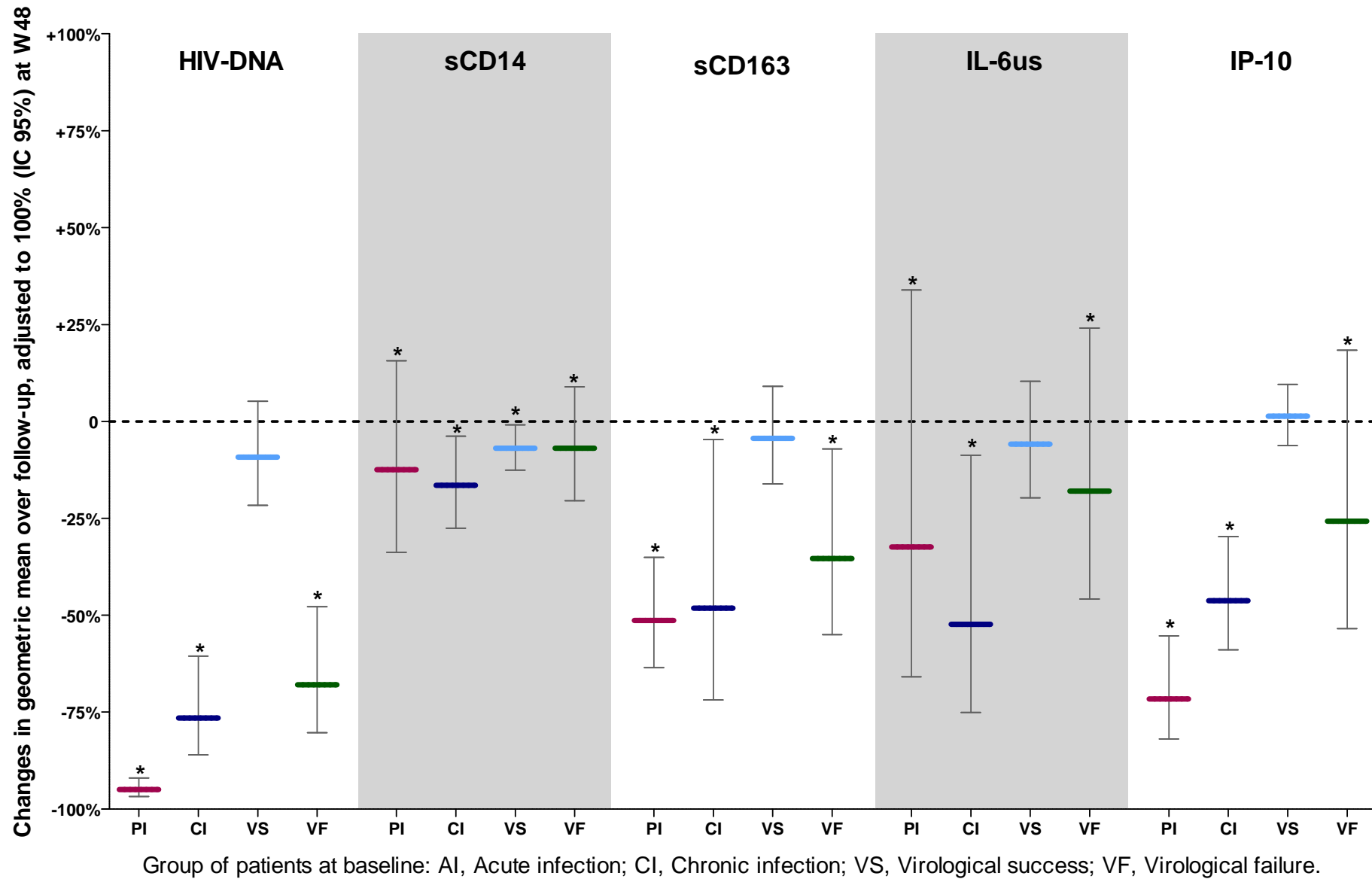
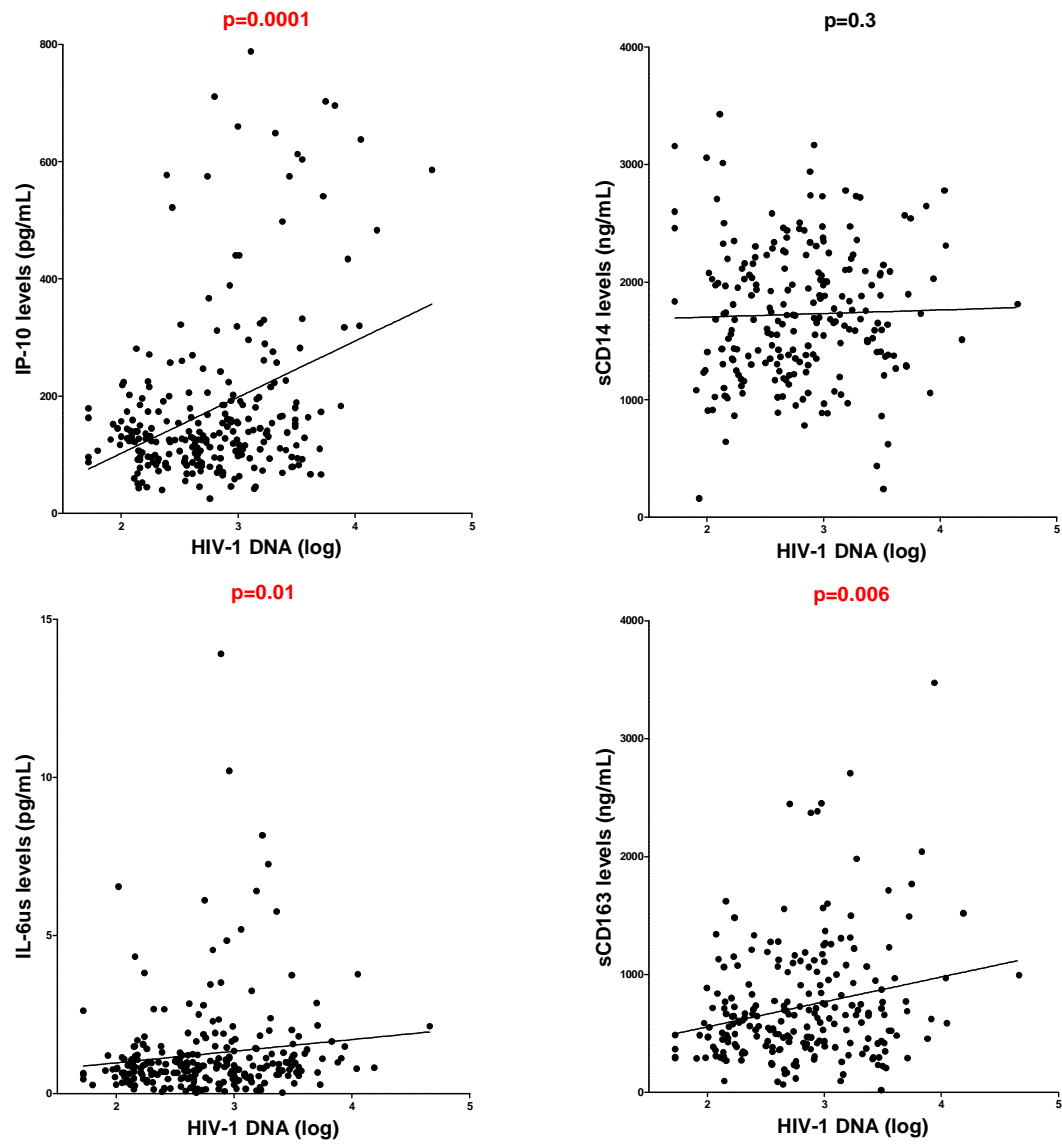




Figure 5. Correlation of immune activation markers with HIV-DNA levels at W48



## Article II

### **DISTRIBUTION AND REDUCTION MAGNITUDE OF HIV-DNA BURDEN IN CD4+ T CELL SUBSETS DEPEND ON ART INITIATION TIMING**

**GANTNER Pierre**, BARNIG Cindy, PARTISANI Marialuisa, LEE Guinevere Q., BECK-WIRTH Geneviève, FALLER Jean-Pierre, MARTINOT Martin, MOSHANI-ZADEH Mahsa, CHENEAU Christine, BATARD Marie-Laure, FISCHER Patricia, FUCHS Anne, URING-LAMBERT Béatrice, BAHRAM Siamak, REY David, FAFI-KREMER Samira.

Article publié dans : **AIDS**, 2018 Feb 8.

Poster présenté à : International Workshop on HIV persistence during therapy. 12-15 décembre, 2017, Miami, FL. Abstract PP 4.21.

Poster présenté à : Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections, 4-7 mars, 2018, Boston, MA. Abstract 346.

## **La distribution de l'ADN VIH total dans les sous populations lymphocytaires T CD4+ dépend du stade clinico-thérapeutique d'instauration d'un traitement antirétroviral**

### ***A. Objectifs de l'analyse***

L'objectif de notre étude est d'analyser la quantité d'ADN-VIH dans les sous-populations lymphocytaires T CD4+ de personnes vivant avec le VIH initiant un traitement par DTG à différents stades cliniques et thérapeutiques. Nous avons analysé de façon longitudinale les prélèvements de CMSP de 27 individus inclus dans les quatre groupes de l'étude DRONE : les personnes en infection aiguë ou primo-infection (AI, n=8), les personnes en infection chronique (CI, n=5), les personnes traitées en succès virologique (VS, n=10) et les personnes traitées en échec virologique (VF, n=4), à J0 et S48 de l'initiation du DTG. Les lymphocytes T CD4+ ont été triés par cytométrie en flux (BD FACS Aria) en effecteur mémoire (TEM), transitionnel mémoire (TTM), central mémoire (TCM) et naïf (TN) [Chomont *et al.* 2009 ; Appay *et al.* 2008]. L'ADN-VIH total a été quantifié dans ces différentes sous-populations par PCR biplec ciblant le LTR du VIH et le gène de l'albumine humaine.

### ***B. Principaux résultats***

Le tri des sous-populations a été réalisé à J0 et S48 pour les 4 groupes, on ne notait pas de différence importante entre groupes et entre les deux visites dans la proportion de chacune des sous-populations cellulaires (Figure 31). La mesure de l'ADN-VIH total dans les différentes sous-populations lymphocytaires T CD4+ a montré une **diminution significative de l'ADN VIH total** entre J0 et S48 chez tous les groupes de patients et dans toutes les sous-populations **sauf** dans les TCM, les TTM et TN des patients en succès virologique (VS) ayant switché pour un traitement comprenant du DTG (Figure 32). De façon intéressante, une régression du niveau d'infection des TEM chez les individus du groupe VS a été notée. Le pourcentage de contribution majoritaire au pool de cellules CD4+ infectées a été notée pour les TTM chez les personnes du groupe AI et pour les TCM dans les autres groupes (Figure 33). Ce pourcentage de contribution n'est pas modifié à S48 du traitement comprenant du DTG.

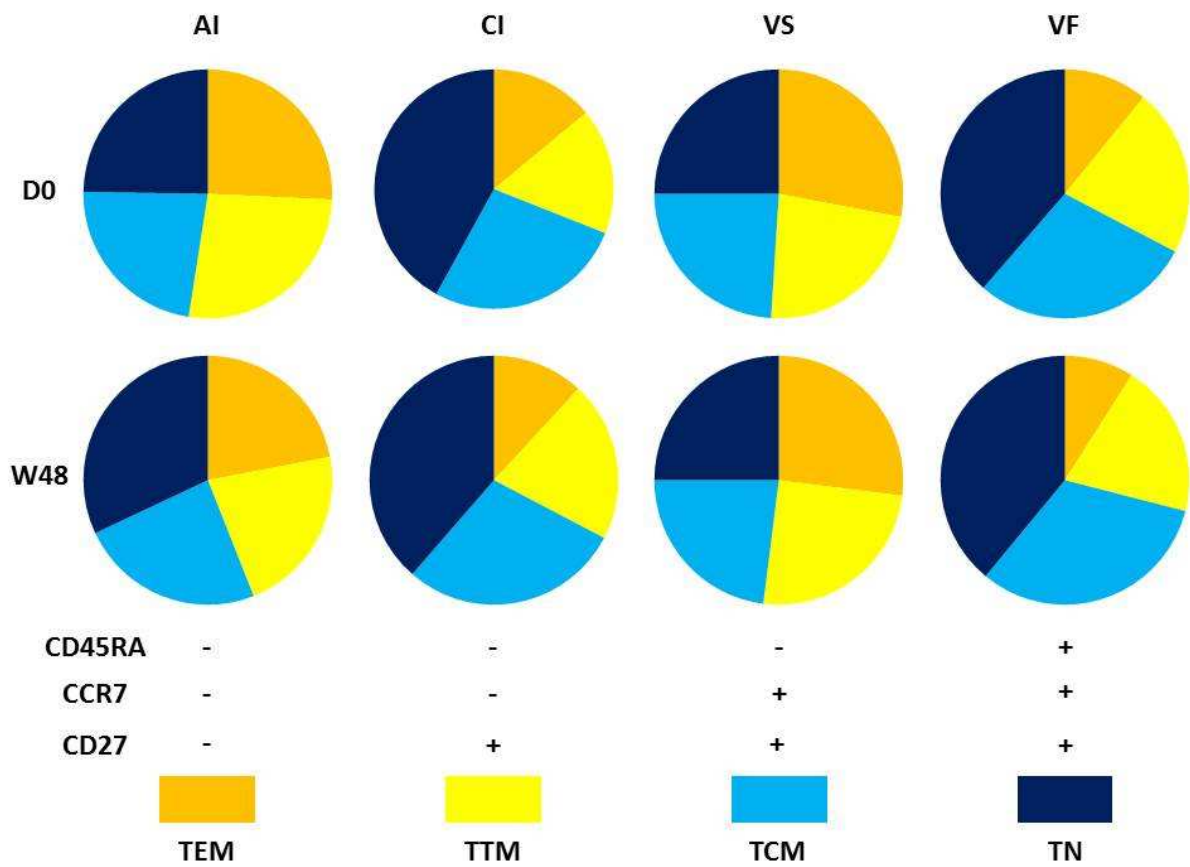


Figure 31. Proportions moyennes des sous-populations lymphocytaires par groupe et par visite

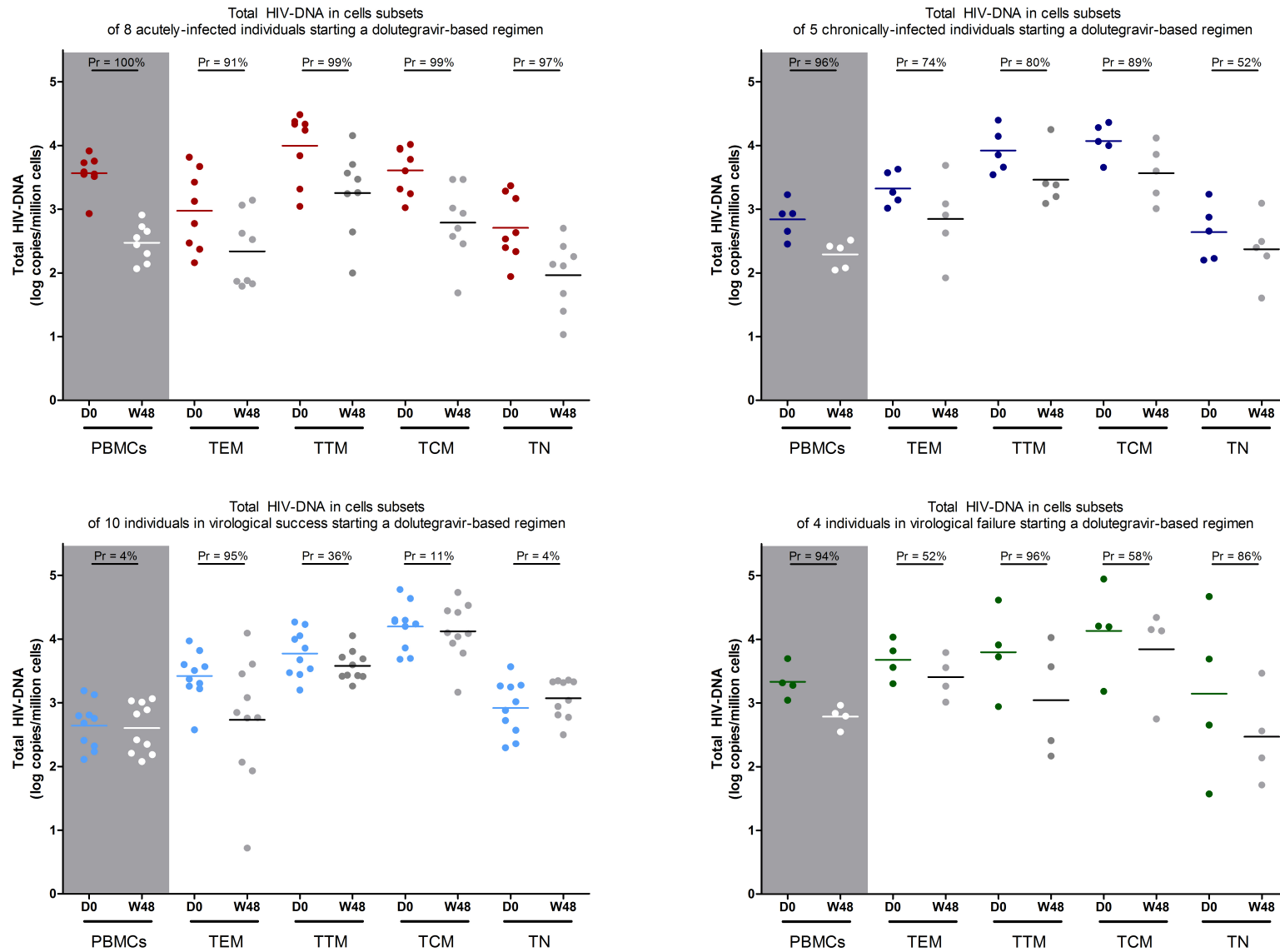


Figure 32. Quantité d'ADN-VIH dans les sous-populations lymphocytaires par groupe et par visite

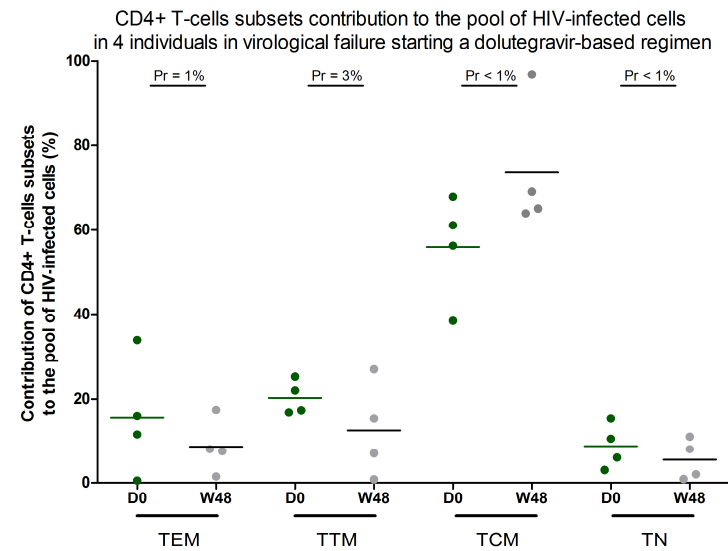
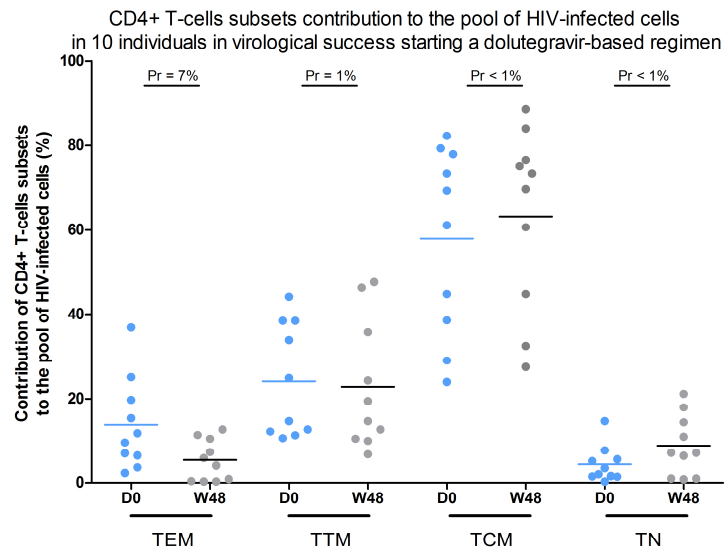
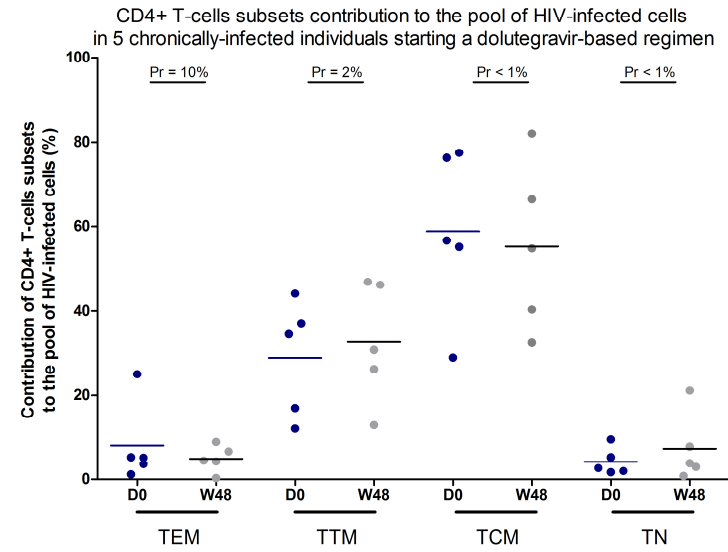
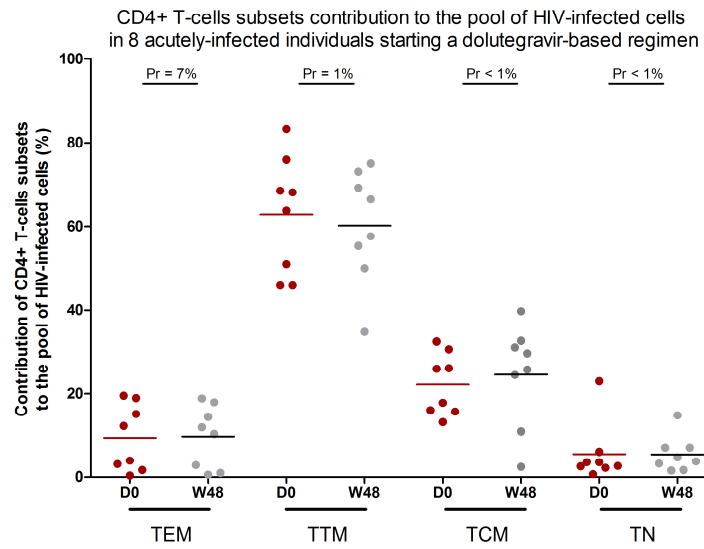


Figure 33. Contribution des sous-populations lymphocytaires T CD4+ au pool de cellules infectées par groupe et par visite

## C. Discussion

Ces résultats suggèrent une évolution du réservoir viral à l'initiation du traitement comprenant du DTG qui dépend fortement du stade clinique et thérapeutique de l'infection par le VIH.

L'étude appuie fortement la recommandation d'initier un traitement rapide dès la primo-infection, avec un double bénéfice :

(1) les niveaux d'ADN-VIH baissent avec la plus forte amplitude lorsque les personnes sont traitées en primo-infection (20% de réduction), et ce dans toutes les sous-populations lymphocytaires.

(2) les TTM contribuent avant et après traitement toujours de façon majoritaire au pool de lymphocytes T CD4+ infectés lorsque l'on traite en primo-infection, alors que dans les autres groupes il s'agit des TCM. Or, il a été montré que la décroissance de l'infection de ces deux sous-populations sous traitement antirétroviral n'est pas la même. Les TCM constituent un réservoir stable avec une prolifération minimale, et les TTM infectés sont continuellement renouvelés par prolifération antigène-induite ou homéostatique [Lambotte *et al.* 2002 ; Chomont *et al.* 2009]. Le réservoir TTM est rempli par la prolifération et la différenciation des TCM dues à l'activation immunitaire [Chomont *et al.* 2009].

Ensemble, ces résultats suggèrent donc qu'un traitement en primo-infection, protège les TCM d'une infection *de novo* et que l'ADN-VIH contenu dans les TTM est fortement réduit par la décroissance de l'activation immunitaire sous traitement. Un traitement précoce limite donc à la fois la taille et la dispersion du réservoir VIH, et pourrait ainsi permettre aux personnes qui en bénéficient de se rapprocher d'une cure fonctionnelle de l'infection [Saez-Cirion *et al.* 2013].

D'autre part et contrairement au résultat obtenu dans les CMSP, une diminution, certes modeste (réduction de 5%) du niveau d'infection des TEM a été objectivée chez les personnes traitées en succès virologique changeant de traitement pour le DTG. Or il a été montré que :

(i) les TEM sont davantage infectées que les autres sous-populations lymphocytaires dans le tissu digestif [Yukl *et al.* 2013].

(ii) les TEM représentent le principal site support de la transcription du VIH sous traitement antirétroviral [Grau-Exposito *et al.* 2017]. Les TEM sont capables de transcription active, mais forment un réservoir instable, principalement localisé dans les tissus inflammés [Chomont *et al.* 2010 ; Serrano-Villar *et al.* 2016].

(iii) les II pourraient avoir un effet sur la réduction de l'inflammation, notamment au niveau intestinal [Lake *et al.* 2016 ; Serrano-Villar *et al.* 2016].

Ensemble, ces résultats suggèrent que comme les TEM représentent la dernière étape de différenciation après stimulation antigénique, le DTG pourrait aider à diminuer l'inflammation, principalement au niveau tissulaire, et ainsi réduire le taux d'infection des TEM.

Le réservoir VIH n'est pas réparti de façon égale dans les sous-populations lymphocytaires T CD4+ en fonction du stade clinique de l'infection à VIH, et le stade à l'initiation d'un traitement comprenant du DTG semble avoir un effet sur la composition de ce réservoir.



## Distribution and reduction magnitude of HIV-DNA burden in CD4<sup>+</sup> T cell subsets depend on art initiation timing

Pierre Gantner<sup>a,b</sup>, Cindy Barnig<sup>b,c</sup>, Marialuisa Partisani<sup>d</sup>,  
Guinevere Q. Lee<sup>e</sup>, Geneviève Beck-Wirth<sup>f</sup>, Jean-Pierre Faller<sup>g</sup>,  
Martin Martinot<sup>h</sup>, Mahsa Mosheni-Zadeh<sup>h</sup>, Christine Cheneau<sup>d</sup>,  
Marie-Laure Batard<sup>d</sup>, Patricia Fischer<sup>d</sup>, Anne Fuchs<sup>a</sup>,  
Béatrice Uring-Lambert<sup>b</sup>, Siamak Bahram<sup>b</sup>,  
David Rey<sup>d</sup> and Samira Fafi-Kremer<sup>a,b</sup>

**Objective:** The aim of our study was to analyze the dynamics of HIV-DNA levels in CD4<sup>+</sup> T-cell subsets in individuals starting successful dolutegravir-based regimens.

**Design:** Twenty-seven individuals with acute infection (AI,  $n = 8$ ) or chronic infection (CI,  $n = 5$ ) and patients in virological success (VS,  $n = 10$ ) or virological failure (VF,  $n = 4$ ) on antiretroviral therapy (ART) who initiated a dolutegravir-based regimen were enrolled (NCT02557997).

**Methods:** CD4<sup>+</sup> T-cells from baseline and week 48 of successful treatment were sorted into effector memory (TEM), transitional memory (TTM), central memory (TCM) and naïve (TN) cell groups for total HIV-DNA measurements by qPCR. Bayesian methods were used to estimate the posterior probability of a HIV-DNA decrease more than 0.25 log copies/10<sup>6</sup> cells at week 48.

**Results:** All patients achieved HIV-RNA suppression at 48 weeks. At baseline and week 48, the highest contributions to the HIV-DNA-infected pool from CD4<sup>+</sup> T cells were observed in TTM cells in the AI group (62.4 and 60.2%, respectively), but in TCM cells for the CI, VS and VF groups (54.6 and 59.4%, 58.2 and 62.9%, 62.4 and 67.2%), respectively. HIV-DNA burden declined in all subsets after 48 weeks of treatment in the AI (probability (Pr) > 91%), CI (Pr > 52%) and VF (Pr > 52%) groups, but only in TEM cells in the VS group (Pr = 95%).

**Conclusion:** Our study showed that dolutegravir-based treatment reduced the HIV-DNA cellular burden in individuals from the AI, CI and VF groups, though the reduction levels differed between the patient subgroups. Early treated patients had the highest probability of HIV-DNA reduction. Interestingly, in the aviremic VS group, HIV-DNA reduction was limited to TEM cells.

Copyright © 2018 Wolters Kluwer Health, Inc. All rights reserved.

<sup>a</sup>Virology Laboratory, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, <sup>b</sup>Strasbourg University, INSERM, UMR-S U1109, F-67000, <sup>c</sup>Physiology, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, <sup>d</sup>Le Trait d'Union, HIV-infection care center, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Strasbourg, France, <sup>e</sup>The Ragon Institute of MGH, MIT and Harvard, Cambridge, Massachusetts, USA, <sup>f</sup>Internal Medicine Department, HIV-infection care center, GHR- Mulhouse Sud Alsace, Mulhouse, <sup>g</sup>Department of Infectious Diseases, Hôpital Nord Franche Comté, Belfort, and <sup>h</sup>Internal Medicine and Rheumatology Department, Hôpital Civil de Colmar, Colmar, France.

Correspondence to Prof Samira Fafi-Kremer, PharmD, PhD, Institut de Virologie, 3 rue Koeberlé, 67000 Strasbourg, France.

Tel: +33 3 69 55 14 38; fax: +33 3 68 85 37 50; e-mail: samira.fafi-kremer@unistra.fr

Received: 11 December 2017; revised: 12 January 2018; accepted: 22 January 2018.

DOI:10.1097/QAD.0000000000001770

**Keywords:** acute infection, chronic infection, HIV-DNA, reservoirs, switch, T cell subsets, virological failure

## Introduction

HIV-1 viral persistence is mostly attributed to long-lasting resting CD4<sup>+</sup> T cells, even when antiretroviral therapy (ART) is used to prevent active replication [1,2]. Even though much is known about the size variation of HIV reservoirs on ART [3,4], there is a need for clinical investigations into CD4<sup>+</sup> T cell-specific subsets that serve as hotspots for viral long-term persistence. Indeed, CD4<sup>+</sup> T cells present vast functional and phenotypic heterogeneity, and it has been shown that HIV can integrate into cell-specific subsets [5–8]. The CD4<sup>+</sup> T cell subsets, including naïve (TN), central memory (TCM), transitional memory (TTM) and effector memory (TEM) cells in a sequential hierarchical order, can differ in their ability to serve as long-lasting viral reservoirs. TCM cells have been described as serving as viral reservoirs during ART and, because of their intrinsic capacity to survive, provide a major long-lasting reservoir [9,10]. However, some recent studies have suggested that TTM cells significantly contribute as viral reservoirs in the early stages of HIV infection and that early ART protects TCM cells from persistent infection [11].

Dolutegravir is the first second-generation integrase strand transfer inhibitor to be approved for clinical use [12]. In part because of its high genetic barrier, it might inhibit HIV-resistant viruses from becoming archived within the viral reservoir [13–15]. We propose that studying the longitudinal changes in HIV reservoir sizes in patients in different clinical stages and who receive the same antiretroviral regimen (e.g. dolutegravir-based) would be an interesting model for understanding both the dynamics of HIV-1 reservoirs and the mechanisms of HIV persistence under ART.

Indeed, ART's impact on the total HIV-DNA burden has not been well studied in the context of different clinical stages. Here, we investigated the impact of dolutegravir-based regimens on total HIV-DNA burden in acute/chronic ART-naïve and viremic/aviremic ART-experienced individuals. We hypothesize that ART could lower the total HIV-DNA burden in all the patient subgroups, but to different extents. We further investigated changes in the HIV-DNA burden in TEM, TTM, TCM and TN CD4<sup>+</sup> T cells.

## Methods

### Study population and study design

This is a substudy from a multicenter prospective longitudinal study including HIV-1-infected adults starting a dolutegravir-based regimen termed DRONE

(NCT02557997). Participants from four groups were enrolled, including treatment-naïve individuals who initiated treatment with a dolutegravir-based regimen during acute infection (AI) or chronic infection (CI) and treatment-experienced individuals who started a dolutegravir-based regimen while in virological success (e.g. HIV-1 RNA < 40 copies/ml, VS) or in the aftermath of virological failure (e.g. HIV-1 RNA > 40 copies/ml, VF). Fifty-four peripheral blood mononuclear cell (PBMC) samples were collected from 27 participants (8, 5, 10 and 4 individuals in the AI, CI, VS and VF groups, respectively) at baseline and weeks 48 post-treatment.

### Ethics statement

All participants gave written informed consent. The study was reviewed and approved by both the Independent Protection Committee East 4 (NCT02557997) and the French Safety Drug Agency (ANSM).

### Flow cytometry of CD4<sup>+</sup> T cell subsets

PBMCs were isolated from blood samples (16 ml) using a Ficoll gradient (Eurobio, Les Ulis, France) and frozen for further cell sorting. CD4<sup>+</sup> T cells were sorted on a FACS Aria (BD Biosciences, San Jose, California, USA) using the 7-AAD Cell viability solution (BD Biosciences), FITC anti-CD3 (UCHT1; eBioscience, San Diego, California, USA) and APC anti-CD4 (RPA-T4; eBioscience). To further isolate the CD4<sup>+</sup> subsets, PBMCs were also labeled with APC-eFluor 780 anti-CD45RA (H1100; eBioscience), PE-Cy7 anti-CCR7 (3D12; eBioscience) and PE anti-CD27 (L128; BD Biosciences). CD4<sup>+</sup> TEM cells were defined as CD45RA-CCR7-CD27-, TTM cells were defined as CD45RA-CCR7-CD27+, TCM cells were defined as CD45RA-CCR7+CD27+, and TN cells were defined as CD45RA+CCR7+CD27+.

### Total HIV-1 DNA extraction and quantification

Total cell-associated DNA was extracted from 20 000 to 2 million sorted cells using a QIAamp DNA micro kit (Qiagen, Courtabeouf, France) with a final elution volume of 35 µl. Total HIV-DNA was quantified from three replicates using a long terminal repeat real-time PCR assay with the Generic HIV-DNA CELL assay (Biocentric, Bandol, France) with a detection threshold of 5 copies per PCR [16]. The results were recorded as either the number of HIV-DNA copies per million cells or as half the absolute count detection limit when HIV-DNA was not detected [11]. Reservoir size detection limits varied according to the available cell numbers and were calculated for each sample.

## Statistical analysis

We used a Bayesian approach to compare the HIV-DNA level changes through the follow-up. Posterior distribution parameter estimates were derived using the JAGS program within the rjags package in R, version 3.1.1 using uninformative prior probabilities [17]. Statistical interpretation of the Bayesian analysis is expressed as the probability (Pr) of observing a difference in the HIV-DNA greater than 0.25 log copies/million cells or a difference in the cell contribution percentage greater than 10% between two time points, two groups or two cell subsets. The 0.25 threshold corresponds to the standard deviation of the PCR assay and was considered clinically relevant [18].

## Results

### Population study

This report analyzed 27 participants (Supplementary Tables 1 and 2, <http://links.lww.com/QAD/B229>) who positively responded to dolutegravir-based regimens (HIV-1 RNA < 40 copies/ml) as of week 24 of treatment. All individuals sustained/achieved virological

control at their 48-week follow-up. Participants were primarily male (93%), with a median age of 44 years. Of note, individuals in the AI group were infected for a median time of 51 days (range 36–81), whereas those in the CI group were infected for 226 days (range 140–7768) based on self-reported data. Individuals in the VS group underwent a median of 6 years (range 4–12) of suppressive ART. Individuals in the VF group were previously suppressed for a median of 8.5 months (range 2–45), subsequently failed therapy and were viremic for 1 month (range 1–4).

### Baseline reservoir description in CD4<sup>+</sup> T cell subsets

Among the CD4<sup>+</sup> T cell subsets, the baseline HIV-DNA burden was high in the TCM cells in the CI, VS and VF groups (mean 4.02, 4.22 and 4.22 log copies/million cells, respectively, Pr > 95%), but was the highest in TTM cells in the AI group (mean 4.04 log copies/million cells, Pr > 89%) (Fig. 1). The major contribution to the total pool of HIV-DNA detected in the four subsets at the pre-dolutegravir treatment baseline was mainly from TCM cells in the CI, VS and VF groups (mean 54.6, 58.2 and 62.4%, respectively, Pr = 100%), whereas TTM cells were the

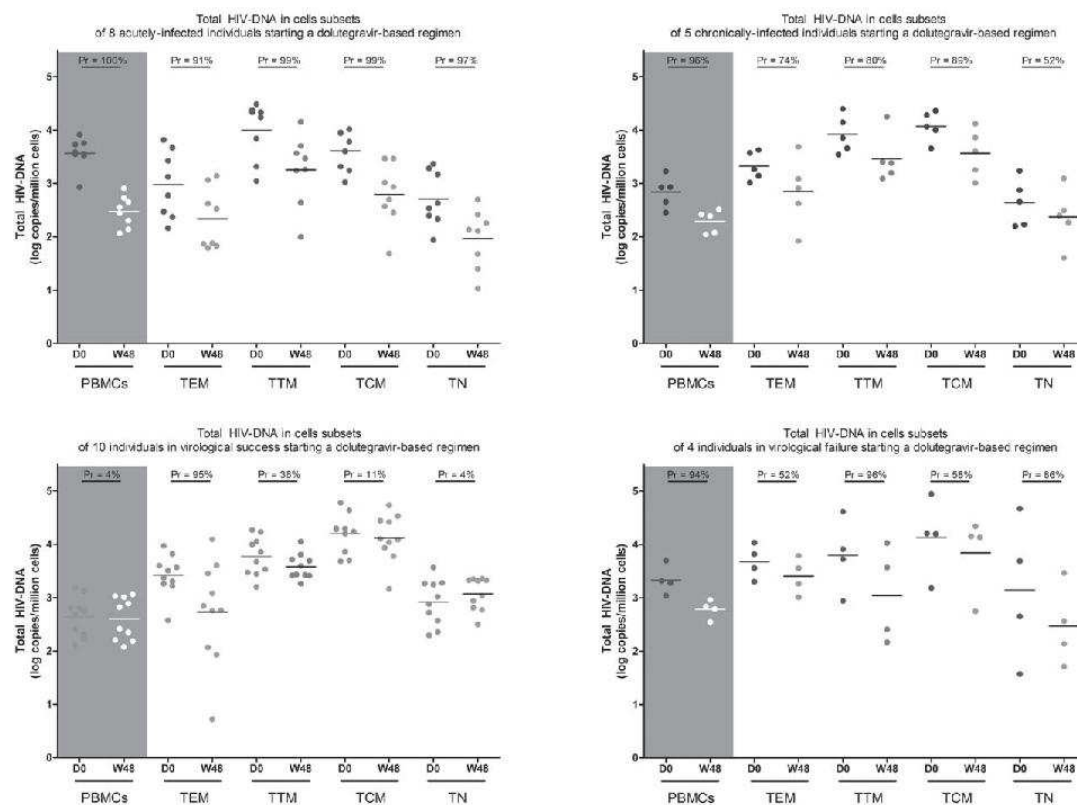


Fig. 1. Dynamic of the HIV-DNA burden in CD4<sup>+</sup> T cells subsets and peripheral blood mononuclear cell (PBMCs) between baseline and week 48 of dolutegravir-based regimen.

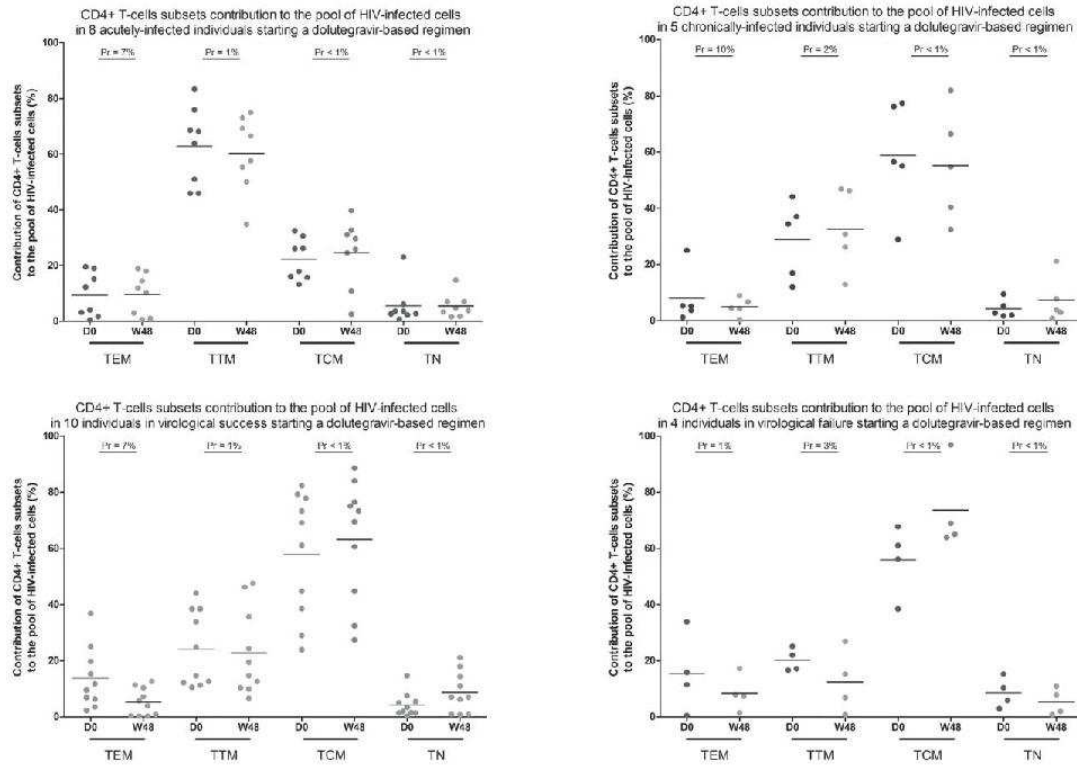


Fig. 2. Dynamic of contribution to the pool of HIV-infected CD4<sup>+</sup> T cells between baseline and week 48 of dolutegravir-based regimen.

main contributors to the pool of HIV-infected CD4<sup>+</sup> T cells (mean 62.4%, Pr = 100%) in the AI group (Fig. 2). There was no association between the absolute CD4<sup>+</sup> T cell count and the frequency of infected TCM and TTM cells.

**Dolutegravir-based regimen lowered HIV-DNA burden**

The HIV-DNA burden declined in all the groups and subsets after 48 weeks of treatment (Pr > 52%), except in the VS group for TTM, TCM and TN cells (Fig. 1). In the VS group, switching to a dolutegravir-based regimen lead to decreased HIV-DNA levels in TEM cells (Pr = 95%), but not in the other subsets. In terms of the magnitude of the observed changes, there was a more than 20% reduction in HIV-DNA levels in all the subsets from the AI group, a more than 10% reduction in the CI and VF groups across all subsets, and a 5% reduction in TEM cells from the VS group.

The dolutegravir-based treatment had no impact on the relative distribution of the HIV-DNA (Fig. 2). Similar to the baseline, TCM cells at week 48 (W48) still hosted the highest levels of HIV-DNA in the CI, VS and VF groups (mean 3.62, 4.10 and 3.76 log copies/million cells, respectively, Pr > 79%), whereas TTM cells had the highest

level in the AI group (mean 3.21 log copies/million cells, Pr = 78%). Also similar to the baseline, TCM cells were the main contributor to HIV-DNA burden in the CI, VS and VF groups at W48 (mean 59.4, 62.9 and 67.2%, respectively, Pr = 100%), whereas TTM was the main contributor in the AI group (mean 60.7%, Pr = 100%).

**Discussion**

It is unclear whether ART initiation at different clinical stages (acute or chronic infection) or ART changes according to therapeutic response (virological success or failure) could yield greater benefits for reducing markers for HIV reservoirs in CD4<sup>+</sup> T cell subsets. By comparing the changes in the HIV-DNA levels in TEM, TTM, TCM and TN cells from individuals on successful dolutegravir-based regimens over 48 weeks, we demonstrated that the distribution of HIV reservoirs strongly depended on the clinical and therapeutic stages of HIV infection at ART initiation.

The contribution to HIV-DNA burden at baseline was mainly from TTM cells in acute infections and from TCM cells in the other groups, with no association with the absolute CD4<sup>+</sup> T cell count [9–11]. Our key finding

is that when patients were viremic at baseline (AI, CI and VF groups), a dolutegravir-based treatment decreased the HIV-DNA burden across all subsets. However, when patients were aviremic and already on suppressive ART at baseline (VS group), switching to a dolutegravir-based regimen resulted in a decrease in TEM cells, but not in other the subsets or in the total PBMCs. This might suggest that compared to and depending on the previous regimens, a switch to dolutegravir could have some specific impacts on TEM cells, but not on the other subsets; thus, this result should further be investigated (i.e. when switching to other ART regimens). TEM cells are transcriptionally active but unstable HIV reservoirs in individuals on ART and mainly located in inflamed tissues [10–20]. As this population represents the last step of immune response upon antigenic stimulation, we hypothesize that dolutegravir helps reduce immune activation via cell-dependent mechanisms, which leads to reduced TEM cell infection levels [20].

The magnitude of HIV-DNA decline at week 48 differed between the patient subgroups, with acutely infected individuals experiencing the most dramatic decline [11]. Furthermore, the HIV-DNA distribution remained stable, with TTM cells being the main contributors to HIV-DNA burden in acutely infected individuals and TCM cells in the other groups. These two subsets are characterized by different decay rates in ART-treated individuals; infected TCM cells constitute a stable reservoir with minimal proliferation levels and infected TTM cells are continuously renewed by self-proliferation due to antigen induction or homeostatic proliferation [9,10]. TTM cell reservoirs are fueled by TCM cell differentiation and proliferation due to immune activation [10]. Together, these results suggest that when ART is initiated in an acute infection, uninfected TCM cells are protected from de-novo infections and the pool of infected TTM cells is dramatically reduced by immune activation from early ART. These findings strongly support the view that early ART might limit the size of viral reservoirs and improve the prospects for a functional HIV cure [11].

Our study has several limitations, including the small number of participants and technical issues. Though the number of participants is limited, it was sufficient to achieve statistically relevant conclusions. Moreover, our well characterized cohort reflects different clinical and therapeutic stages of HIV infection, but does not allow comparison with other ART regimens. Indeed, whether our observations hold true when other classes of drugs are used needs to be investigated.

In conclusion, our study showed that a dolutegravir-based treatment reduced the HIV-DNA burden in all patients, though the probability of reduction differed between the clinical and therapeutic stages of HIV infection. Early treated patients had the highest probability of HIV-DNA

reduction. Interestingly, in aviremic participants switching to a dolutegravir-based regimen, HIV-DNA reduction was limited to TEM cells.

## Acknowledgements

The authors would like to thank all participants and acknowledge Stéphanie Bertsch and Frédéric Jegou for their technical assistance.

Author contributions: P.G., C.B., M.P., D.R. and S.F.-K. conceptualization; P.G., C.B., M.P., G.B.-W., J.-P.F., M.M., M.M.-Z., C.C., M.-L.B., P.F., A.F. and D.R. data curation; P.G., C.B. and A.F. performed the experiments; P.G., C.B. and G.Q.L. formal analysis; P.G., G.Q.L. and S.F.-K. methodology; S.F.-K. project administration; B.U.-L., S.B. and S.F.-K. supervision; P.G. writing – original draft preparation; C.B., M.P., G.B.-W., J.-P.F., M.M., M.M.-Z., C.C., M.-L.B., D.R. and S.F.-K. writing – review and editing.

This study was funded by Strasbourg University Hospital (registration number, PRI-HUS #2014–5073) and the Institut de Médecine et d'Epidémiologie Appliquée (IMEA).

## Transparency declarations

This study was funded by the Strasbourg University Hospital (registration number, PRI-HUS #2014–5073) and Institut de Médecine et d'Epidémiologie Appliquée (IMEA).

## Conflicts of interest

The authors have no conflicts of interest to declare.

## References

1. Finzi D, Hermankova M, Pierson T, Carruth LM, Buck C, Chaisson RE, *et al.* Identification of a reservoir for HIV-1 in patients on highly active antiretroviral therapy. *Science* 1997; **278**:1295–1300.
2. Strain MC, Günthard HF, Havlir DV, Ignacio CC, Smith DM, Leigh-Brown AJ, *et al.* Heterogeneous clearance rates of long-lived lymphocytes infected with HIV: intrinsic stability predicts lifelong persistence. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; **100**:4819–4824.
3. Siliciano JD, Kajdas J, Finzi D, Quinn TC, Chadwick K, Margolick JB, *et al.* Long-term follow-up studies confirm the stability of the latent reservoir for HIV-1 in resting CD4<sup>+</sup> T cells. *Nat Med* 2003; **9**:727–728.
4. Burgard M, Boufassa F, Viard JP, Garrigues I, Ruffault A, Izopet J, *et al.* Factors influencing peripheral blood mononuclear cell-associated HIV-1 DNA level after long-term suppressive antiretroviral therapy in 236 patients. *AIDS* 2009; **23**:2165–2171.
5. Cohn LB, Silva IT, Oliveira TY, Rosales RA, Parrish EH, Learn GH, *et al.* HIV-1 integration landscape during latent and active infection. *Cell* 2015; **160**:420–432.

6. Lee GQ, Orlova-Fink N, Einkauf K, Chowdhury FZ, Sun X, Harrington S, *et al.* Clonal expansion of genome-intact HIV-1 in functionally polarized Th1 CD4+ T cells. *J Clin Invest* 2017; **127**:2689–2696.
7. Chavez L, Calvanese V, Verdin E. HIV latency is established directly and early in both resting and activated primary CD4 T cells. *PLoS Pathog* 2015; **11**:e1004955.
8. Soriano-Sarabia N, Archin NM, Bateson R, Dahl NP, Crooks AM, Kuruc JD, *et al.* Peripheral V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells are a novel reservoir of latent HIV infection. *PLoS Pathog* 2015; **11**:e1005201.
9. Lambotte O, Demoustier A, de Goer MG, Wallon C, Gasnault J, Goujard C, *et al.* Persistence of replication-competent HIV in both memory and naïve CD4 T cell subsets in patients on prolonged and effective HAART. *AIDS* 2002; **16**:2151–2157.
10. Chomont N, El-Far M, Ancuta P, Trautmann L, Procopio FA, Yassine-Diab B, *et al.* HIV reservoir size and persistence are driven by T cell survival and homeostatic proliferation. *Nat Med* 2009; **15**:893–900.
11. Chéret A, Bacchus-Souffan C, Avettand-Fenoël V, Mélard A, Nembot G, Blanc C, *et al.* Combined ART started during acute HIV infection protects central memory CD4+ T cells and can induce remission. *J Antimicrob Chemother* 2015; **70**:2108–2120.
12. Osterholzer DA, Goldman M. Dolutegravir: a next-generation integrase inhibitor for treatment of HIV infection. *Clin Infect Dis* 2014; **59**:265–271.
13. Mespède T, Wainberg MA. Resistance against integrase strand transfer inhibitors and relevance to HIV persistence. *Viruses* 2015; **7**:3703–3718.
14. Wainberg MA, Han YS, Mespède T. Might dolutegravir be part of a functional cure for HIV? *Can J Microbiol* 2016; **62**:375–382.
15. Brenner BG, Wainberg MA. Clinical benefit of dolutegravir in HIV-1 management related to the high genetic barrier to drug resistance. *Virus Res* 2017; **239**:1–9.
16. Avettand-Fenoël V, Chaix ML, Blanche S, Burgard M, Floch C, Toure K, *et al.* LTR real-time PCR for HIV-1 DNA quantitation in blood cells for early diagnosis in infants born to seropositive mothers treated in HAART area (ANRS CO 01). *J Med Virol* 2009; **81**:217–223.
17. Gaudet CE. Review of doing Bayesian data analysis: a tutorial with R, JAGS, and Stan (second edition). *Clin Neuropsychol* 2017; **31**:1268–1270.
18. Gantner P, Mélard A, Damond F, Delaugerre C, Dina J, Gueudin M, *et al.* Interlaboratory quality control of total HIV-1 DNA load measurement for multicenter reservoir studies. *J Med Virol* 2017; **89**:2047–2050.
19. Appay V, van Lier RA, Sallusto F, Roederer M. Phenotype and function of human T lymphocyte subsets: consensus and issues. *Cytometry A* 2008; **73**:975–983.
20. Serrano-Villar S, Sainz T, Ma ZM, Utay NS, Chun TW, Mann S, *et al.* Effects of combined CCR5/integrase inhibitors-based regimen on mucosal immunity in HIV-infected patients naïve to antiretroviral therapy: a pilot randomized trial. *PLoS Pathog* 2016; **12**:e1005381.

**Supplementary Table 1: Baseline demographics and disease characteristics**

| #ID | Group | Sexe | Age (years) | HIV transmission | CDC stage | HIV subtype | Previous ART  | DTG Backbone |
|-----|-------|------|-------------|------------------|-----------|-------------|---------------|--------------|
| 1   | AI    | M    | 38          | MSM              | A2        | B           | NA            | TDF/FTC      |
| 2   | AI    | F    | 45          | HTS              | A1        | CRF02_AG    | NA            | TDF/FTC      |
| 3   | AI    | M    | 49          | HTS              | A2        | B           | NA            | ABC/3TC      |
| 4   | AI    | M    | 30          | MSM              | A1        | B           | NA            | ABC/3TC      |
| 5   | AI    | M    | 24          | MSM              | A2        | B           | NA            | ABC/3TC      |
| 6   | AI    | M    | 41          | MSM              | A2        | C           | NA            | ABC/3TC      |
| 7   | AI    | M    | 21          | MSM              | A1        | B           | NA            | ABC/3TC      |
| 8   | AI    | M    | 36          | MSM              | A2        | B           | NA            | ABC/3TC      |
| 9   | CI    | M    | 47          | MSM              | C2        | B           | NA            | ABC/3TC      |
| 10  | CI    | M    | 24          | MSM              | A2        | B           | NA            | ABC/3TC      |
| 11  | CI    | M    | 20          | MSM              | A1        | B           | NA            | TDF/FTC      |
| 12  | CI    | F    | 30          | HTS              | A1        | ND          | NA            | ABC/3TC      |
| 13  | CI    | M    | 48          | MSM              | A2        | B           | NA            | ABC/3TC      |
| 14  | VS    | M    | 54          | MSM              | A2        | ND          | RAL+TDF/FTC   | TDF/FTC      |
| 15  | VS    | M    | 29          | MSM              | A3        | B           | MVC+RAL+LPV/r | RPV          |
| 16  | VS    | M    | 55          | HTS              | A3        | ND          | DRV/r+ABC/3TC | ABC/3TC      |
| 17  | VS    | M    | 66          | HTS              | C3        | ND          | ETR+ABC/3TC   | ABC/3TC      |
| 18  | VS    | M    | 27          | MSM              | A2        | B           | RPV/TDF/FTC   | ABC/3TC      |
| 19  | VS    | M    | 50          | Unknown          | C3        | ND          | NVP+ABC/3TC   | ABC/3TC      |
| 20  | VS    | M    | 57          | HTS              | A3        | CRF01_AE    | RPV/TDF/FTC   | ABC/3TC      |
| 21  | VS    | M    | 62          | MSM              | B3        | B           | TPV/r+ETR+RAL | TDF/FTC      |
| 22  | VS    | M    | 58          | MSM              | A2        | B           | DRV/r+TDF/FTC | ABC/3TC      |
| 23  | VS    | M    | 48          | Unknown          | A2        | B           | RPV/TDF/FTC   | ABC/3TC      |
| 24  | VF    | M    | 44          | MSM              | A2        | B           | DRV/r+ABC/3TC | ABC/3TC      |
| 25  | VF    | M    | 41          | MSM              | C3        | B           | RPV/TDF/FTC   | DRV/r        |
| 26  | VF    | M    | 49          | HTS              | A2        | CRF02_AG    | DRV/r+TDF/FTC | ABC/3TC      |
| 27  | VF    | M    | 24          | MSM              | A1        | B           | RPV/TDF/FTC   | ABC/3TC      |

ART, Antiretroviral therapy; M, Male; F, Female, MSM, Men who have Sex with Men; HTS, HTS transmission; AI, Acute Infection; CI, Chronic Infection; VS, Virological Success; VF, Virological Failure; NA, Not applicable; ND, Not documented; TDF, Tenofovir disoproxil fumarate; FTC, emtricitabine; ABC, Abacavir; 3TC, lamivudine; RPV, Rilpivirine, DRV, Darunavir; MVC, maraviric; RAL, raltegravir; LPV, lopinavir; ETR, etravirine; NVP, nevirapine; TPV, tipranavir; /r, ritonavir.

**Supplementary Table 2: Immunovirological parameters at baseline**

| N  | Group | Median HIV-RNA (log copies/mL) | Median CD4+ T cells count (/mm <sup>3</sup> ) |
|----|-------|--------------------------------|---|
| 8  | AI    | 5,8                            | 469   |
| 5  | CI    | 4,0                            | 440   |
| 10 | VS    | 1,6                            | 617   |
| 4  | VF    | 3,1                            | 387   |

AI, Acute Infection; CI, Chronic Infection; VS, Virological Success; VF, Virological Failure.



## Article III

### **DOLUTEGRAVIR RESHAPES THE GENETIC DIVERSITY OF HIV-1 RESERVOIRS**

**GANTNER Pierre**, LEE Guinevere Q., REY David, MESPLEDE Thibault, PARTISANI Marialuisa, CHENEAU Christine, BECK-WIRTH Geneviève, FALLER Jean-Pierre, MOHSENI-ZADEH Mahsa, MARTINOT Martin, WAINBERG Mark A., FAFI-KREMER Samira.

Article publié dans : **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 2017 Dec 13.

Poster présenté à : Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections, 13–16 février, 2017, Seattle, WA. Abstract 495.

## **Dynamique importante de la diversité génétique du réservoir viral sous dolutegravir.**

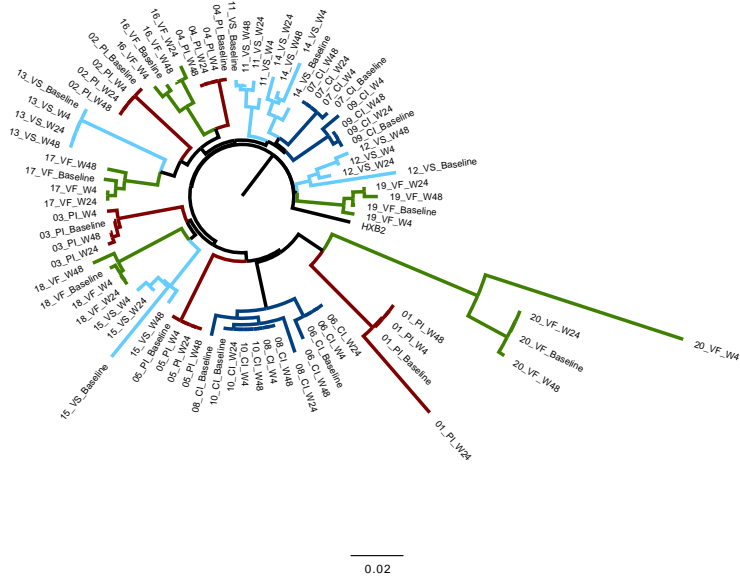
### ***A. Objectifs de l'analyse***

L'objectif de notre étude est d'analyser la quantité et la diversité génétique de la quasiespèce virale archivée dans le compartiment sanguin personnes vivant avec le VIH initiant un traitement par DTG à différents stades cliniques et thérapeutiques. Nous avons analysé de façon longitudinale les prélèvements de CMSP de 20 individus inclus dans les quatre groupes de l'étude DRONE : les personnes en infection aiguë ou primo-infection (AI, n=5), les personnes en infection chronique (CI, n=5), les personnes traitées en succès virologique (VS, n=5) et les personnes traitées en échec virologique (VF, n=5), à J0, S4, S24 et S48 de l'initiation du DTG. Les gènes de l'*intégrase* en deux amplicons (Int1 et Int2) et de la *boucle V3* de l'ADN VIH ont été séquencés en haut débit (Roche/454).

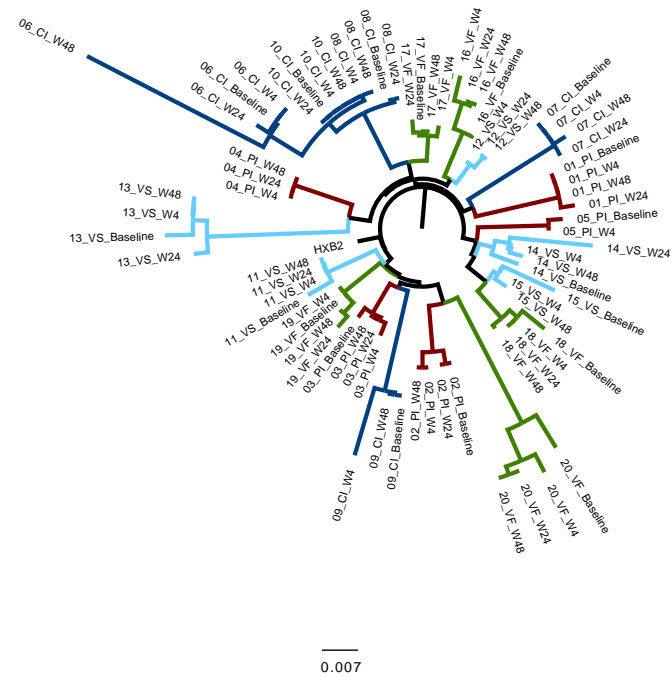
### ***B. Principaux résultats***

Les séquences obtenues en séquençage à haut débit sur le gène de l'intégrase et celui de la boucle V3 de la GP120, ont permis d'analyser la dynamique du réservoir ADN VIH au cours de temps. Une séquence consensus pour chaque prélèvement a été obtenue en sommant tous les variants présents dans la quasiespèce et a été placée sur un arbre phylogénétique (Figure 34). La diversité génétique a également été calculée (entropie de Shannon) pour chaque visite/patient ainsi que les valeurs d'ADN VIH total (Figure 35).

(a)



(b)



(c)

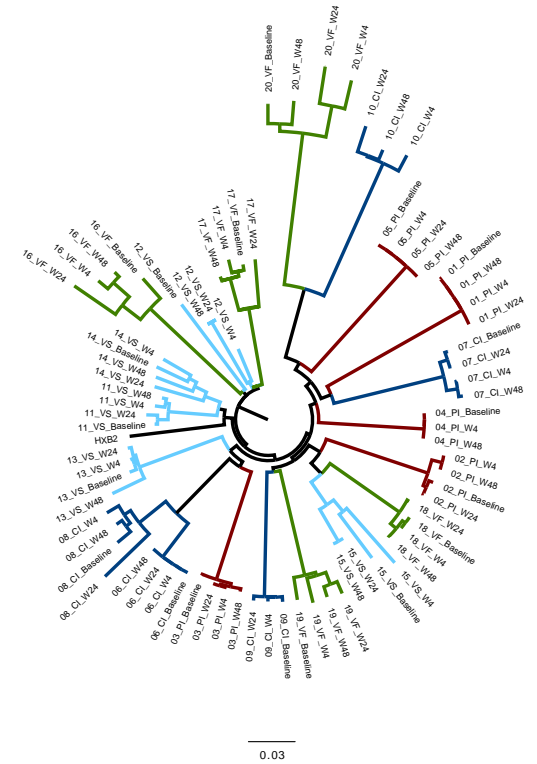
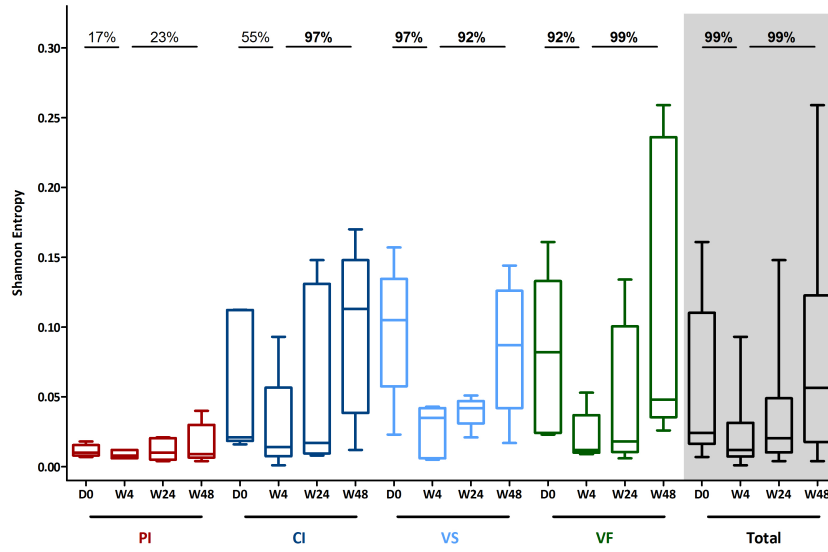


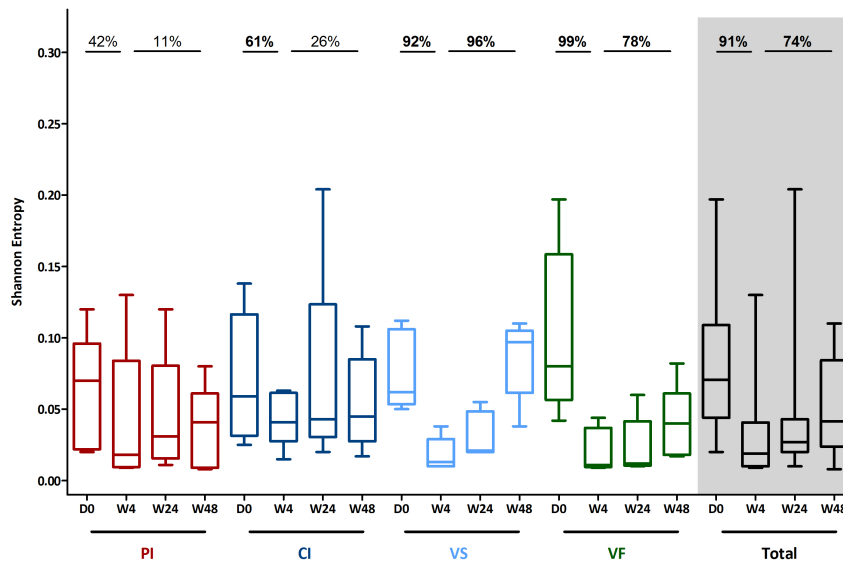
Figure 34. Arbres phylogénétiques des séquences consensus par patient/visite.

Les séquences consensus pour les gènes de l'intégrase (partie 1 (a) et partie 2 (b)) et de la boucle V3 (c) dans l'ADN VIH sanguin sont représentés par patients (#ID) par groupe (AI en bordeaux, CI en bleu foncé, VS en bleu clair et VF en vert) et par date (J0, S4, S24 et S48).

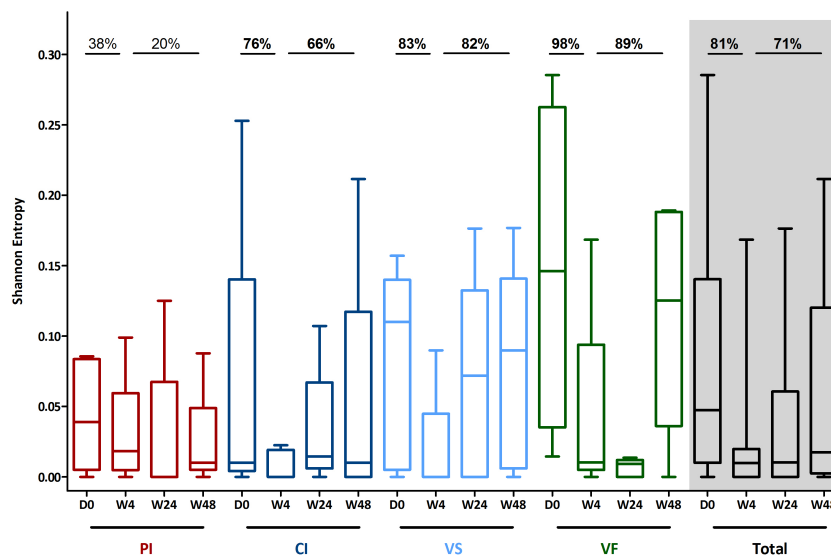
(a)



(b)



(c)



*Figure 35. Dynamique de la diversité génétique des variants archivés dans l'ADN VIH*

*La diversité génétique par la mesure de l'entropie de Shannon pour les gènes de l'intégrase (partie 1 (a) et partie 2 (b)) et de la boucle V3 (c) dans l'ADN VIH sanguin sont représentés par groupe de patients (AI, CI, VS, VF et total) et par date (J0, S4, S24 et S48).*

Sur ces deux représentations on peut noter que :

(1) pour les **patients traités en primo-infection (PI)** ont une faible diversité génétique à J0 et que cette faible diversité est maintenue au cours du temps. Sur les arbres phylogénétiques (branches rouges/bordeau) les séquences consensus des quatre visites sont identiques (branche unique par patient). Souvent un unique variant remplit toutes les CMSP et ce variant persiste à l'initiation du traitement antirétroviral par DTG et ce malgré la baisse progressive du niveau d'ADN VIH total dans les CMSP (Figure 3).

(2) Pour les **autres groupes de patients (CI, VS, VF)**, la diversité génétique à J0 est plus élevée. A la mise sous traitement antirétroviral ou au moment du switch, on observe une baisse précoce et transitoire de la diversité génétique à S4 (Figure 3). Cette diversité ré-augmente ensuite au cours du temps pour atteindre à S48 un niveau similaire à celui de J0. Donc, même chez des patients contrôlés virologiquement depuis 10 ans en moyenne (groupe VS), un switch vers un traitement comprenant du DTG entraîne une réorganisation du réservoir viral, sans en modifier la taille.

Dans cette étude ancillaire, nous avons montré que l'instauration ou le switch vers un traitement contenant du DTG chez les patients **naïfs en primo-infection**, les patients **naïfs en infection chronique**, les patients **prétraités en échec virologique** et les patients **prétraités en succès virologique**, induit :

- 1- une **diminution de l'ADN-VIH total** chez tous les patients **sauf** ceux **prétraités en succès virologique**.
- 2- Une **diminution significative de la diversité génétique de l'ADN VIH total** à 4 semaines post-traitement chez tous les patients **y compris** ceux **prétraités en succès virologique**.
- 3- Une **ré-augmentation de la diversité génétique** chez tous les patients à 24 semaines post-traitement **sauf** chez les patients **traités en primo-infection**.

- 4- **L'évolution de la diversité génétique** a été observée sur le **gène de l'intégrase** et celui de la **boucle V3** de la GP120.

### ***C. Discussion***

Ces résultats suggèrent une dynamique importante du réservoir viral. Nous proposons un modèle évolutif des quasiespèces archivées dans l'ADN VIH avec (Figure 36) :

- (1) une diminution quantitative du réservoir VIH en traitant en primo-infection avec une diversité génétique faible et stable, un seul clone viral remplissant le réservoir sanguin.
- (2) une diminution quantitative de l'ADN VIH en traitant en infection chronique ou en échec virologique sous traitement. L'initiation d'un traitement efficace entraîne également une modification de la diversité génétique avec une inflexion précoce puis une re-diversification de la quasiespèce.
- (3) une quantité d'ADN VIH stable en modifiant le traitement antirétroviral chez des patients traités en succès en virologique. La modification du traitement entraîne dans ce cas également une modification de la diversité génétique avec une inflexion précoce puis une re-diversification de la quasiespèce.

Cette dynamique pourrait être le reflet d'un échange entre le sang périphérique et les réservoirs sanctuaires et/ou de la réplication résiduelle [Palmer *et al.* 2008 ; Bastarache *et al.* 2014]. La différence observée entre les patients traités en primo-infection et ceux traités en infection chronique pourrait également s'expliquer par une distribution virale différente entre les sous-populations cellulaires et la persistance potentielle d'une réplication virale résiduelle chez les patients traités en phase chronique [Palmer *et al.* 2008]. En effet, des différences dans l'archivage en termes de distribution de l'intégration, de la réplication et de l'entrée du virus ont été observées entre les sous-populations suivantes en fonction du stade clinique auquel un traitement antirétroviral a été initié : (i) les sous-populations lymphocytaires T CD4+ [Soriano-Sarabia *et al.* 2014 ; Woods *et al.* 1997 ; Zerbato *et al.* 2016 ; Yukl *et al.* 2013 ; Chomont *et al.* 2009] ; (ii) cellules T CD4+ latentes *versus* activées [Cohn *et al.* 2015 ; Brady *et al.* 2009 ; Chavez *et al.* 2015 ; Murray *et al.* 2014 ; Campbell *et al.* 2010] et (iii) entre différents compartiments notamment entre sang et tractus génital [Anderson *et al.* 2010 ; Gantner *et al.* 2016 ; Klein *et al.* 2018].

Pour explorer ces deux hypothèses, l'étude de la diversité virale de l'ADN-VIH dans les sous-populations cellulaires et dans d'autres compartiments comme le tractus génital semblent nécessaires. La détermination de la quantité et de la diversité génétique de l'ADN VIH total (génomme entier) dans différents compartiments et de leur évolution dans le temps chez les quatre groupes de patients cités ci-dessus apporterait des informations cruciales quant à la dynamique virale sous traitement antirétroviral efficace contenant un inhibiteur d'intégrase de 2<sup>ème</sup> génération.

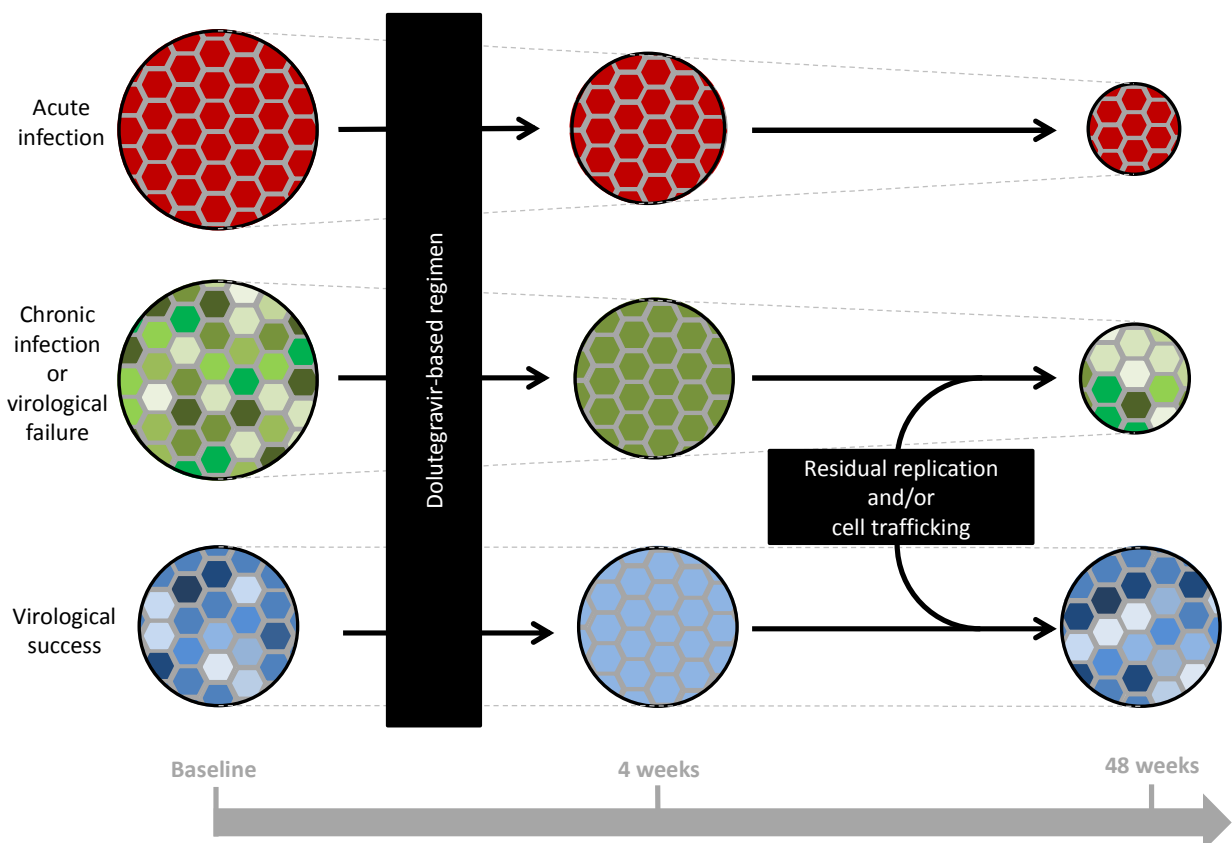


Figure 36. Dynamique de la diversité génétique des variants archivés dans l'ADN VIH

La dynamique de la quasispèce viral archivée dans les cellules sanguines est représentée par une variation quantitative (modification ou non de la taille des cercles comprenant la quasispèce) et qualitative (modification ou non des couleurs représentant les variants).

**En résumé,** nos résultats suggèrent une dynamique importante du réservoir viral. Cette dynamique pourrait être le reflet d'un échange entre le sang périphérique et les réservoirs sanctuaires. La différence observée entre les patients traités en primo-infection et ceux traités en infection chronique pourrait également s'expliquer par une distribution virale différente

entre les sous-populations cellulaires et la persistance potentielle d'une répllication virale résiduelle chez les patients traités en phase chronique.



## Dolutegravir reshapes the genetic diversity of HIV-1 reservoirs

Pierre Gantner<sup>1,2</sup>, Guinevere Q. Lee<sup>3</sup>, David Rey<sup>4</sup>, Thibault Mesplede<sup>5,6</sup>, Marialuisa Partisani<sup>4</sup>, Christine Cheneau<sup>4</sup>, Geneviève Beck-Wirth<sup>7</sup>, Jean-Pierre Fallier<sup>8</sup>, Mahsa Mohseni-Zadeh<sup>9</sup>, Martin Martinot<sup>9</sup>, Mark A. Wainberg<sup>5,6</sup> and Samira Fafi-Kremer<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Virology Laboratory, Strasbourg University Hospitals, Strasbourg, France; <sup>2</sup>Strasbourg University, INSERM, UMR-S 1109, F-67000 Strasbourg, France; <sup>3</sup>The Ragon Institute of MGH, MIT and Harvard, Cambridge, MA, USA; <sup>4</sup>Le Trait d'Union, HIV-infection care center, CHU de Strasbourg, Strasbourg, France; <sup>5</sup>McGill University AIDS Centre, Lady Davis Institute for Medical Research, Jewish General Hospital, Montreal, Quebec, Canada; <sup>6</sup>Department of Microbiology and Immunology, McGill University, Montreal, Quebec, Canada; <sup>7</sup>Internal Medicine Department, HIV-infection care center, GHR Mulhouse Sud Alsace, Mulhouse, France; <sup>8</sup>Department of Infectious Diseases, Hôpital Nord Franche Comté, Belfort, France; <sup>9</sup>Internal Medicine and Rheumatology Department, Hôpital Civil de Colmar, Colmar, France

\*Corresponding author. Institut de Virologie, 3 rue Koeberlé, 67000 Strasbourg, France. Tel: +33-3-69-55-14-38; Fax: +33-3-68-85-37-50; E-mail: samira.fafi-kremer@unistra.fr

Received 13 September 2017; returned 25 October 2017; revised 14 November 2017; accepted 15 November 2017

**Objectives:** Better understanding of the dynamics of HIV reservoirs under ART is a critical step to achieve a functional HIV cure. Our objective was to assess the genetic diversity of archived HIV-1 DNA over 48 weeks in blood cells of individuals starting treatment with a dolutegravir-based regimen.

**Methods:** Eighty blood samples were prospectively and longitudinally collected from 20 individuals (NCT02557997) including: acutely ( $n = 5$ ) and chronically ( $n = 5$ ) infected treatment-naïve individuals, as well as treatment-experienced individuals who switched to a dolutegravir-based regimen and were either virologically suppressed ( $n = 5$ ) or had experienced treatment failure ( $n = 5$ ). The integrase and V3 loop regions of HIV-1 DNA isolated from PBMCs were analysed by pyrosequencing at baseline and weeks 4, 24 and 48. HIV-1 genetic diversity was calculated using Shannon entropy.

**Results:** All individuals achieved or maintained viral suppression throughout the study. A low and stable genetic diversity of archived HIV quasispecies was observed in individuals starting treatment during acute infection. A dramatic reduction of the genetic diversity was observed at week 4 of treatment in the other individuals. In these patients and despite virological suppression, a recovery of the genetic diversity of the reservoirs was observed up to 48 weeks. Viral variants bearing dolutegravir resistance-associated substitutions at integrase position 50, 124, 230 or 263 were detected in five individuals ( $n = 5/20$ , 25%) from all groups except those who were ART-failing at baseline. None of these substitutions led to virological failure.

**Conclusions:** These data demonstrate that the genetic diversity of the HIV-1 reservoir is reshaped following the initiation of a dolutegravir-based regimen and strongly suggest that HIV-1 can continue to replicate despite successful treatment.

### Introduction

HIV reservoirs are rapidly established following infection<sup>1</sup> and despite being partly reduced early in treatment, they can persist in the form of integrated proviral DNA for decades even when ART is used to prevent active replication.<sup>2,3</sup> To date, neither current ART strategies nor ongoing 'shock and kill' studies have yet succeeded to significantly reduce HIV reservoirs to undetectable levels.<sup>4-6</sup> Accordingly, HIV reservoirs are quantitatively stable for lengthy periods of time, effectively preventing viral eradication.<sup>7-9</sup> The existence of genetic variability within those reservoirs and the

contribution of residual replication to their active maintenance during ART both remain controversial.<sup>10-15</sup> Recent studies have suggested that, in some patients, the viral reservoir is genetically stable and can be maintained by clonal expansion of latently infected cells.<sup>16,17</sup> Others have argued for the existence of cryptic tissue-bound persistent replication under ART.<sup>14</sup>

Dolutegravir was the first second-generation integrase strand transfer inhibitor (INSTI) to be approved for clinical use.<sup>18</sup> In part because of its high genetic barrier, dolutegravir is thought to be able to reduce HIV reservoirs.<sup>19-21</sup> In contrast, ART intensification with or when switched to the first-generation INSTI raltegravir had

© The Author 2017. Published by Oxford University Press on behalf of the British Society for Antimicrobial Chemotherapy. All rights reserved. For Permissions, please email: journals.permissions@oup.com.

no significant effect on viral reservoirs.<sup>22–24</sup> Whether this would also hold true if dolutegravir was used for treatment intensification remains unstudied. To date, no data to our knowledge is yet available about the effect (if any) of dolutegravir on the levels and genetic diversity of the HIV reservoirs. The specific effect of INSTIs in blocking the HIV integration process, combined with the high genetic barrier of dolutegravir might influence the maintenance of the HIV reservoir since persistent replication under ART is involved in this process.<sup>19</sup> We hypothesize that studying the HIV diversity of archived quasispecies in individuals starting a dolutegravir-based regimen (DBR) would be an interesting model for understanding both the dynamics of the HIV-1 reservoirs and the mechanisms of HIV persistence under ART.<sup>25</sup> Thus our objective was to prospectively assess the dynamics of blood-archived HIV-DNA quasispecies over 48 weeks in individuals starting successful DBR at different clinical and therapeutic stages of HIV infection using an ultra-deep sequencing technique.

## Methods

### Study population and study design

This is a substudy of a multicentre prospective longitudinal study including HIV-1-infected adults starting a DBR termed DRONE (impact of a Dolutegravir-based regimen on Reservoirs Of treatment-Naïve and -Experienced individuals, Clinicaltrials.gov: NCT02557997). Participants from four groups were enrolled: treatment-naïve individuals who initiated treatment with a DBR during acute (e.g. less than 6 weeks post-infection) infection (AI) or chronic infection (CI), and treatment-experienced individuals who started a DBR while in virological success (VS; e.g. HIV-1 RNA <50 copies/mL) or in the aftermath of virological failure (VF; e.g. HIV-1 RNA >50 copies/mL).

Eighty PBMC samples were collected from 20 participants (5 in each group) at baseline and week 4 (W4), week 24 (W24) and week 48 (W48) of successful DBR (Figure S1, available as Supplementary data at JAC Online).

### Ethics statement

All participants gave written informed consent. The study was reviewed and approved by both Independent Protection Committee East 4 (NCT02557997) and the French Safety Drug Agency (ANSM).

### Total HIV-1 DNA extraction and quantitation

Total cell-associated DNA was extracted from 1 million PBMCs in duplicate using the automated QIAextractor system (QIAGEN, Courtabeuf, France), with a final elution volume of 100 µL. Total HIV-1 DNA was quantified by long terminal repeat (LTR) real-time PCR assay with the Generic HIV DNA CELL assay (Biocentric, Bandol, France) as described previously.<sup>26</sup>

### Amplicon generation

Three bulk PCR amplicons of approximately 400 bp encompassing the whole integrase (two amplicons: Int1 4359–4743 and Int2 4743–5102 positions on HIV-1 HXB2) and the V3 loop (one amplicon: 7026–7360 positions on HIV-1 HXB2) were generated from 200 000 PBMCs per PCR (Table S1). Amplification of each amplicon was individually performed with unique 454 multiplex identification tags (MID) in duplicate and PCR products were then mixed for the sequencing step. First round and nested PCR were carried out with Phusion High Fidelity PCR Master Mix with HF Buffer (Thermo Scientific, Vilnius, Lithuania).

### Ultra-deep sequencing

Each amplicon was purified with Agencourt AMPure XP magnetic beads (Beckman Coulter, Krefeld, Germany). Amplicons were analysed by Agilent DNA 1000 chips on Bioanalyser (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) to verify their quality and purity. The purified amplicons were quantitated with a fluorescence assay Quant-iT PicoGreen (Invitrogen, Eugene, OR, USA) according to the manufacturer's instructions. Purified amplicons were pooled in equimolar amounts. Clonal amplification on beads (emulsion PCR), bead isolation (breaking) and sequencing on a GS Junior (Roche/454, Meylan, France) were all performed according to the manufacturer's protocol. For each participant, the four samples from each timepoint and the three amplicons were deep-sequenced in the same pyrosequencing run.

### Sequence analysis

Sequence reads were analysed with the GS Amplicon Variant Analyzer (AVA) software (Roche), which assigns each read to the proper amplicon and individual sample using 454 MID. This software also aligns individual sequence reads with the HIV WT HXB2 sequence. Notably, 454 pyrosequencing has known homopolymer issues.<sup>27</sup> To correct for homopolymer issues, first an in-house R-script was used to generate one homopolymer-corrected consensus sequence per sample from the post-AVA aligned files. In this approach, 'consensus sequence' was defined as the most frequently observed nucleotide at each base position ('A', 'T', 'C', 'G' or '-'). This was followed by the removal of all gap characters in the final consensus sequences. The assumption is that homopolymer errors at a single position would not constitute the most frequently observed base, therefore by removing gap characters, homopolymer errors would not be carried over into the consensus sequence. Next, another in-house R-script was used to correct homopolymer issues in each small read. This script first aligned each raw small read to the sample-specific homopolymer-corrected consensus sequence. Then, for each base position: (i) if the small read indicated '-', but the sample-specific consensus sequence was A, C, T or G, our software would replace the base in the small read with 'N'; and (ii) if the read indicated A, C, T or G, but the sample-specific consensus sequence was '-', this '-' character would be removed from the small read. These two steps would correct for any (i) deletions and (ii) insertions that are likely artefacts resulting from the homopolymer issue. A random sample (subject ID#1, baseline, V3 loop, 3105 small reads) was used to compare results derived from our in-house scripts against a published homopolymer correction algorithm RC454.<sup>28</sup> Absolute sequence identities derived from the two algorithms were 97% concordant. In the majority of discordance cases, our in-house script was over-conservative, calling N instead of taking a base call from the consensus sequence. We used a cut-off of 20 reads to consider variants.

To further validate this overall approach, four PBMC samples (one random sample per subject group) were subjected to re-sequencing in separate 454 runs to assess the reproducibility of the results. Samples later identified with integrase resistance mutations by ultra-deep sequencing consensus sequence were re-extracted and re-tested by Sanger sequencing to confirm the existence of the resistance mutations (Figure S2).

Phylogenetic trees were generated using the corrected consensus sequence and Clustal X neighbour-joining tree.

INSTI resistance mutations were identified using the Stanford drug resistance mutation list (updated 2017; <http://hivdb.stanford.edu>). Resistant variant sequences were tested for APOBEC-induced hypermutation on Hypermut (<https://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/HYPERMUT/hypermut.html>).<sup>29</sup> The tropism of each variant was inferred from the V3 amino acid sequence by geno2pheno available at [www.geno2pheno.org](http://www.geno2pheno.org). Viral quasispecies diversity was defined by Shannon entropy.<sup>30</sup> This measure was calculated as  $-\sum p_i \log_2(p_i) / \log_2(N)$  where  $p_i$  is the relative frequency of each variant  $i$  ( $i = 1; \dots; n$ , where  $n$  is the number of variants per sample) and  $N$  is the total number of sequences analysed per sample. Entropy results can vary from 0 (single variant) to 1 (each sequence represents a single variant). We used a Bayesian approach to compare genetic

**Table 1.** Baseline demographics and disease characteristics

| Group | ID# | Sex | Age (years) | HIV transmission | Fiebig stage | HIV-1 RNA (log <sub>10</sub> copies/mL) | Virological control (years) | CD4 T cells (/mm <sup>3</sup> ) | HIV-1 DNA (log <sub>10</sub> copies/10 <sup>6</sup> PBMCs) | HIV-1 subtype | Backbone |
|-------|-----|-----|-------------|------------------|--------------|---|-----------------------------|---------------------------------|--|---------------|----------|
| AI    | 1   | M   | 44          | MSM              | II           | 5.75                                    | NA                          | 730                             | 3.39   | B             | TDF/FTC  |
|       | 2   | M   | 20          | MSM              | V            | 4.43                                    | NA                          | 520                             | 3.25   | B             | TDF/FTC  |
|       | 3   | M   | 51          | MSM              | IV           | 6.99                                    | NA                          | 331                             | 3.96   | B             | TDF/FTC  |
|       | 4   | M   | 44          | MSM              | V            | 4.28                                    | NA                          | 314                             | 2.96   | B             | TDF/FTC  |
|       | 5   | M   | 28          | MSM              | V            | 5.26                                    | NA                          | 731                             | 3.81   | B             | TDF/FTC  |
| CI    | 6   | M   | 24          | MSM              | NA           | 5.64                                    | NA                          | 441                             | 3.61   | B             | ABC/3TC  |
|       | 7   | M   | 23          | MSM              | NA           | 5.31                                    | NA                          | 226                             | 2.24   | B             | ABC/3TC  |
|       | 8   | M   | 22          | MSM              | NA           | 4.35                                    | NA                          | 457                             | 3.07   | B             | ABC/3TC  |
|       | 9   | F   | 56          | HTS              | NA           | 4.10                                    | NA                          | 1140                            | 1.78   | B             | TDF/FTC  |
|       | 10  | F   | 78          | HTS              | NA           | 3.56                                    | NA                          | 218                             | 2.34   | A1            | ABC/3TC  |
| VS    | 11  | F   | 53          | HTS              | NA           | <1.60                                   | 11                          | 1326                            | 2.56   | B             | ABC/3TC  |
|       | 12  | F   | 63          | transfusion      | NA           | <1.60                                   | 11                          | 592                             | 2.67   | B             | ABC/3TC  |
|       | 13  | M   | 63          | HTS              | NA           | <1.60                                   | 8                           | 794                             | 2.23   | B             | RPV      |
|       | 14  | M   | 45          | MSM              | NA           | <1.60                                   | 9                           | 1185                            | 2.45   | B             | TDF/FTC  |
|       | 15  | M   | 47          | MSM              | NA           | <1.60                                   | 9                           | 663                             | 2.28   | B             | ABC/3TC  |
| VF    | 16  | M   | 50          | MSM              | NA           | 2.08                                    | NA                          | 655                             | 2.75   | B             | ABC/3TC  |
|       | 17  | M   | 44          | MSM              | NA           | 2.96                                    | NA                          | 416                             | 2.46   | B             | TDF/FTC  |
|       | 18  | F   | 37          | HTS              | NA           | 4.53                                    | NA                          | 162                             | 3.11   | CRF01_AE      | ABC/3TC  |
|       | 19  | M   | 39          | MSM              | NA           | 5.90                                    | NA                          | 69                              | 3.03   | B             | ABC/3TC  |
|       | 20  | M   | 42          | HTS              | NA           | 5.20                                    | NA                          | 93                              | 3.55   | B             | ABC/3TC  |

M, male; F, female; HTS, heterosexual transmission; NA, not applicable; TDF, tenofovir disoproxil fumarate; FTC, emtricitabine; ABC, abacavir; 3TC, lamivudine; RPV, rilpivirine.

variability changes over follow-up assuming that genetic diversity follows a normal distribution  $N(\mu, \sigma^2)$ . Posterior distribution parameter estimates were derived using the JAGS program within the rjags package in R version 3.1.1 and were generated using Markov chain Monte Carlo computation and uninformative prior probabilities: the coefficients on  $\mu$  were  $N(0, 0.01)$  and on  $1/\sigma^2$  were  $\Gamma(0.05, 0.05)$ .<sup>31</sup> Comparisons between two timepoints are expressed as the probability of observing a difference in Shannon entropy greater than 0.025, which was found to be a virologically relevant threshold.<sup>30</sup>

## Results

### Population study

This report analyses 20 participants positively responding to DBR (HIV-1 RNA <40 copies/mL) as of week 12 of DBR (Table 1). All individuals sustained virological control during follow-up. Associated backbones were abacavir/lamivudine (55%), tenofovir disoproxil fumarate/emtricitabine (40%) and rilpivirine (5%). Participants were primarily male (75%), with a median age of 44 years. Sixty-five percent were men who have sex with men and 90% of individuals harboured HIV-1 subtype B. Of note, individuals in the AI group were Fiebig stage V or less and individuals in the VS group underwent a median of 10 years (range, 8–11) of suppressive ART.

### HIV-DNA and ultra-deep sequencing

A total of 80 PBMC samples (baseline, W4, W24 and W48) were analysed for cell-associated HIV-DNA (Table 2), which ranged from 81 to 46 189 copies of HIV-DNA/million PBMCs. Mean decreases in amounts of cell-associated HIV-DNA between baseline and W48 were  $-1.30$ ,  $-0.56$ ,  $-0.10$  and  $-0.54$  log<sub>10</sub> copies/million PBMCs for the AI, CI, VS and VF groups, respectively. All sequences were successfully amplified from the 80 PBMC samples and yielded a median of 2122, 2801 and 2479 reads per Int1, Int2 and V3 amplicon, respectively.

### Genetic diversity

Assuming that the 454 homopolymer produces the same Shannon entropy background noise across groups we calculated the genetic diversity for each amplicon (integrase in two parts and V3 loop) by individual at each timepoint (baseline, W4, W24 and W48) according to the inclusion group (Figure 1). Results were similar for the three amplicons; we will take the V3 loop as an example. Mean genetic diversity in HIV-DNA was of 0.041 at baseline in individuals starting a DBR in the AI group. In this group, genetic diversity remained stable through follow-up (0.018 at W48). Indeed, almost only one major variant was detected at each timepoint in the blood reservoir in this population. In the other groups

**Table 2.** Total HIV-DNA measurements and changes in archived INSTI resistance substitutions from baseline

| Group | ID# | Baseline   |   | W4   |   | W24  |   | W48  |   |
|-------|-----|--|---|--|---|--|---|--|---|
|       |     | HIV-1 DNA (log <sub>10</sub> copies/10 <sup>6</sup> PBMCs) | substitution changes from baseline (% quasispecies) | HIV-1 DNA (log <sub>10</sub> copies/10 <sup>6</sup> PBMCs) | substitution changes from baseline (% quasispecies) | HIV-1 DNA (log <sub>10</sub> copies/10 <sup>6</sup> PBMCs) | substitution changes from baseline (% quasispecies) | HIV-1 DNA (log <sub>10</sub> copies/10 <sup>6</sup> PBMCs) | substitution changes from baseline (% quasispecies) |
| AI    | 1   | 4.19   | /   | 3.88   | /   | 2.97   | /   | 2.13   | /   |
|       | 2   | 3.71   | /   | 3.30   | N230S (36.3%)                                       | 2.04   | /   | 2.01   | N230S (66.0%)                                       |
|       | 3   | 4.66   | /   | 4.29   | /   | 3.54   | /   | 3.52   | /   |
|       | 4   | 3.32   | /   | 3.37   | /   | 2.30   | /   | 2.30   | /   |
|       | 5   | 4.05   | /   | 3.11   | /   | 2.61   | /   | 2.66   | /   |
| CI    | 6   | 3.83   | /   | 3.53   | /   | 2.95   | /   | 2.60   | /   |
|       | 7   | 2.98   | /   | 2.70   | /   | 2.85   | /   | 2.51   | /   |
|       | 8   | 3.49   | /   | 2.76   | /   | 2.54   | /   | 2.22   | /   |
|       | 9   | 2.75   | /   | 2.04   | R263K (84.5%)                                       | 2.18   | /   | 2.61   | /   |
|       | 10  | 2.02   | /   | 2.40   | /   | 2.12   | /   | 1.91   | /   |
| VS    | 11  | 2.85   | /   | 3.24   | /   | 3.00   | /   | 2.55   | /   |
|       | 12  | 3.09   | /   | 3.45   | M50I (77.2%)<br>A124T (100%)                        | 3.56   | M50I (76.6%)<br>A124T (76.6%)                       | 3.53   | M50I (100%)<br>A124T (100%)                         |
|       | 13  | 2.68   | /   | 2.18   | /   | 2.49   | /   | 2.16   | /   |
|       | 14  | 2.96   | /   | 2.71   | I50T (100%)   | 2.92   | I50M (86.6%)  | 2.91   | I50T (83.6%)  |
|       | 15  | 2.61   | /   | 2.45   | /   | 2.56   | /   | 2.62   | T50I (100%)   |
| VF    | 16  | 3.14   | /   | 2.80   | /   | 3.03   | /   | 2.94   | /   |
|       | 17  | 2.71   | /   | 2.63   | /   | 2.52   | /   | 2.40   | /   |
|       | 18  | 3.38   | /   | 3.30   | /   | 2.14   | /   | 2.44   | /   |
|       | 19  | 3.44   | /   | 3.86   | /   | 3.17   | /   | 3.09   | /   |
|       | 20  | 3.94   | /   | 3.46   | /   | 2.97   | /   | 3.22   | /   |

/ indicates identity with baseline.

(CI, VS and VF), a high level of genetic diversity at baseline was observed (0.058, 0.078 and 0.148, respectively). The start of DBR in these individuals was associated with a transient decrease in the genetic diversity of either *pol* or *env* sequences at W4 (0.008, 0.018 and 0.024, respectively). At this timepoint, only one major variant was detected in all individuals in the blood reservoir. There was a 92% probability of observing a diversity drop-off greater than 0.025 between baseline and W4. In these groups, HIV-1 proviral genetic diversity increased to levels similar to baseline from W24 to W48 (0.042, 0.074 and 0.115 at W48, respectively). There was an 84% probability of observing a re-increase in diversity greater than 0.025 between W4 and W48.

For each amplicon (Int1, Int2 and V3), we constructed phylogenetic trees of HIV-DNA consensus sequences by individual and by date (Figure 2). We found that for subjects treated during AI, HIV-DNA consensus sequences intermingled between timepoints. On the contrary, individuals from the CI, VS and VF groups harboured HIV-DNA sequences that differed from one timepoint to another.

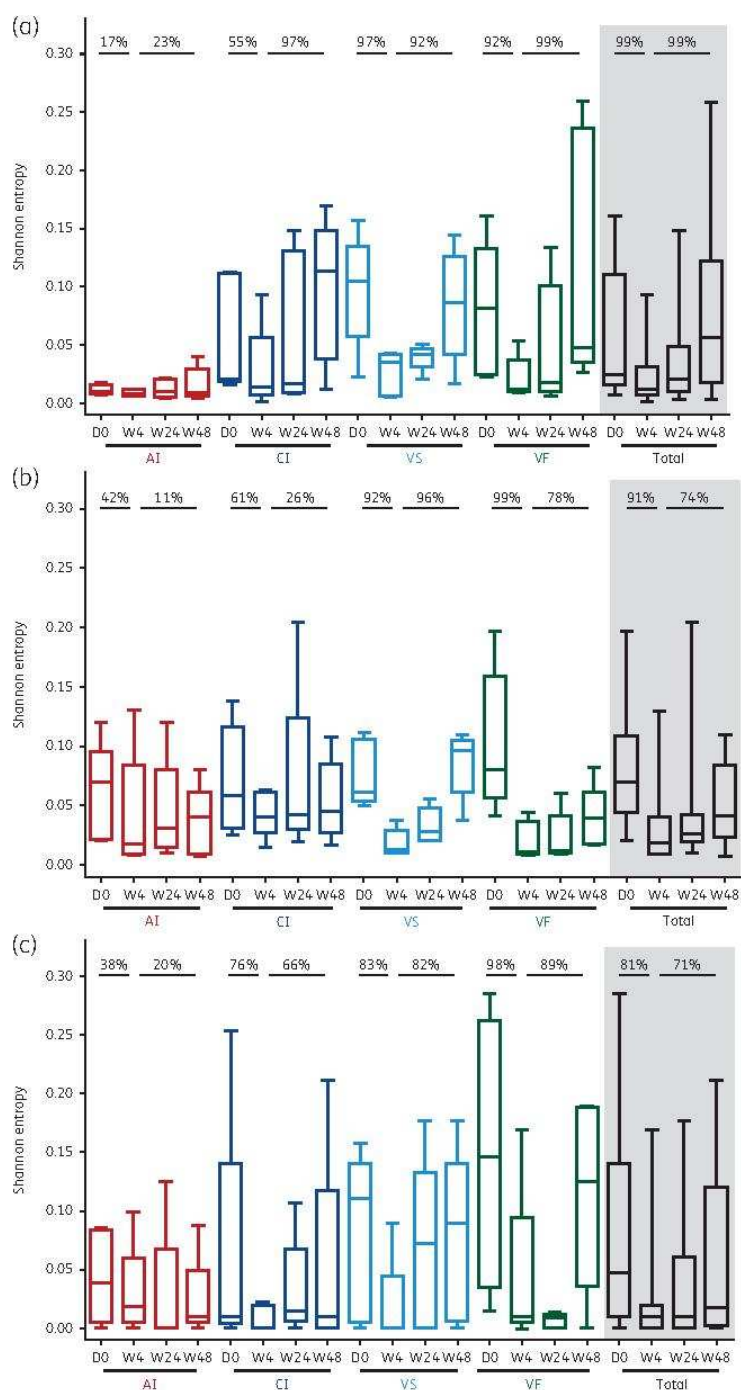
### Drug resistance amino acid substitutions

Among 20 participants, we detected minor resistance-associated mutations in the proviral DNA from five individuals (25%; Table 2).

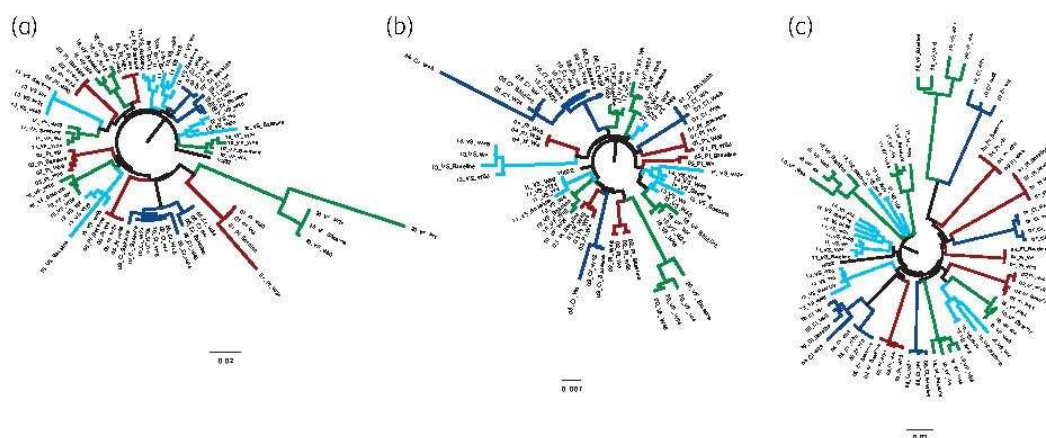
Remarkably, the R263K substitution was transiently detected in one individual (subject ID#9) from the CI group at W4 as the major variant (84% R263K variants and 16% baseline variants). The dolutegravir-specific R263K substitution was confirmed through Sanger sequencing (Figure S2). The R263K variant was genetically distinct from the baseline variant by seven nucleotide changes (five were G-to-A mutations), but harboured no stop codons and was not considered hypermutated ( $P=0.1$ ). Proviruses from three individuals from the VS group harboured various substitutions in the N-terminal region (subject ID#15: T50I at W48; subject ID#12: M50I at W4, W24 and W48; subject ID#14: I50T at W4 and W48, and I50M at W24) and the N230S substitution was observed in one individual from the AI group (Fiebig V) at W4 and W48 (subject ID#2). In subject ID#12, M50I was associated with the A124T substitution. Importantly, no major resistance-associated substitutions such as Q148, Y143 or N155 were detected.

### Discussion

Understanding the dynamics and persistence of HIV reservoirs under ART is important for evaluating the efficacy of future interventions aimed at curing HIV infection. In this study, we examined the genetic diversity of HIV-1 DNA isolated from the PBMCs of individuals starting a DBR at different clinical and therapeutic stages of



**Figure 1.** Dynamics of genetic diversity on DBR. The mean genetic diversity measured by Shannon entropy in integrase part 1 (a), integrase part 2 (b) and V3 loop (c) is depicted for each group of inclusion and at each timepoint [baseline (D0), W4, W24 and W48 of DBR]. Data are coloured according to the group of inclusion: AI in red, CI in dark blue, VS in light blue and VF in green. Statistical comparison is expressed by the calculated probability of observing a difference greater than 0.025 between baseline/W4 and W4/W48 by Bayesian analysis. This figure appears in colour in the online version of JAC and in black and white in the print version of JAC.



**Figure 2.** Constructed phylogenetic trees of consensus sequences for each amplicon: integrase part 1 (a), integrase part 2 (b) and V3 loop (c). Each branch corresponds to a single timepoint for each individual and is labelled as: group of inclusion, ID# and date (baseline, W4, W24 and W48 of DBR). The branches are coloured according to the group of inclusion: AI in red, CI in dark blue, VS in light blue and VF in green. This figure appears in colour in the online version of *JAC* and in black and white in the print version of *JAC*.

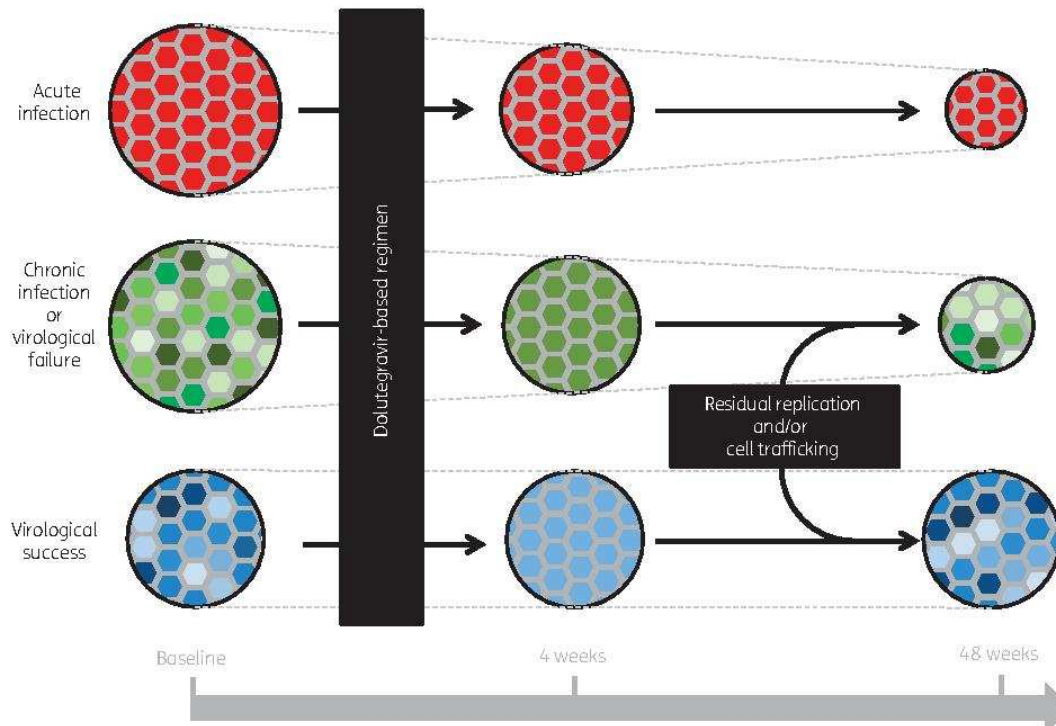
HIV infection by ultra-deep sequencing. We demonstrated for the first time a specific pattern of genetic diversity while changing or initiating successful DBR: (i) genetic diversity remains low in individuals starting a DBR during AI; (ii) a dramatic decrease in viral diversity at W4 of DBR occurs in other individuals; (iii) a re-increase in viral diversity over time occurs in all individuals except those initiating DBR during the acute phase; and (iv) a selection of amino acid substitutions specifically associated with resistance to INSTI can occur during DBR. Our data suggest that switching from other drug regimens to a DBR, even after long periods of viral suppression, can influence the genetic makeup of the HIV-1 reservoir.

Focusing on the five individuals who initiated a DBR during AI, we found that HIV-1 reservoirs were composed almost uniquely of only one viral variant that filled the PBMC DNA reservoir and that this single variant persisted under ART. We can hypothesize that blood cells may harbour the single transmitted founder clone,<sup>32</sup> filling all the HIV reservoirs at baseline and on follow-up. In AI, it was shown that a single viral cluster circulated throughout blood and other reservoirs.<sup>33,34</sup> The persistence of a stable unique variant during DBR is indicative of the absence of low-level viral replication in this population of patients. Whether longer periods of time will slowly increase the genetic diversity of the reservoirs in these individuals is a critical question. Based on our results that all individuals successfully treated for ~10 years (VS group) did possess a highly diversified reservoir, we hypothesize that this will also become true for the AI patients. However, individuals treated during primary infection achieve very low levels of HIV reservoirs while on ART and thus may have a lower risk of residual replication.<sup>35</sup> Alternatively, our results may be explained by the immune pressure of cytotoxic T lymphocyte (CTL) response on the genetic diversity of the viral reservoirs in acutely infected patients. Indeed, participants of this group initiated therapy at Fiebig stages II ( $n=1$ ), IV ( $n=1$ ) or V ( $n=3$ ) and the acquisition of CTL-escape genetic mutations occurs mostly at stage V.<sup>36,37</sup> We have not looked for such escape

mutations in our study and thus effects of CTL pressure on HIV-1 genetic diversity have been overlooked.

In contrast with acutely infected individuals, participants from all the other groups, i.e. those initiating DBR during CI or in the aftermath of VF or those who are virologically controlled on ART switching to DBR, all showed a profound shift in the genetic diversity of the HIV-1 reservoirs. For these individuals, our results show: (i) a high level of viral diversity at baseline and (ii) an early genetic homogenization of the viral reservoirs after 4 weeks of DBR initiation/switch, followed by (iii) a slow increase in genetic diversity that eventually reached levels similar to that at baseline, after one year of treatment. This last observation could be owing to either low levels of persistent residual replication under ART<sup>38</sup> or cell trafficking from tissues to the blood compartments.<sup>39</sup> Indeed, the HIV cellular reservoir shows high diversity in terms of cell subtypes, anatomical location, half-life and cell homeostasis. In these different kinds of reservoirs, both selective immune pressure and drug pressure might be variable.<sup>17,40-43</sup> In this regard, the detection of variants bearing drug-specific resistance-associated mutations may be significant.

Although drug resistance is extremely rare against dolutegravir, treatment failure with DBR has been commonly associated with the emergence of the R263K integrase substitution.<sup>44,45</sup> We report here three important observations. First, major variants bearing the R263K substitution did emerge and were archived within the DNA of one individual under DBR. Second, detecting R263K in the proviral DNA was not associated with VF. Third, multiple changes at integrase position 50 were also detected over time in the viral reservoirs of individuals using DBR. In all cases, these changes at position 50 were conserved over time. We previously showed the emergence of the R263K and M50I combination of substitutions in tissue culture selection experiments with dolutegravir.<sup>44</sup> Position 50 is naturally polymorphic whereas R263K is a rare polymorphic resistance-associated substitution. Either of the R263K or M50I substitutions confer similar low levels (~2-fold) of resistance to



**Figure 3.** Modelling of the dynamics of archived quasispecies in PBMCs according to the timing of DBR initiation. The size variations of the HIV quasispecies archived in PBMCs is represented by the size of the circles. Diversity in quasispecies is depicted by different or unique colours (depending on the case) within the quasispecies. This figure appears in colour in the online version of *JAC* and in black and white in the print version of *JAC*.

dolutegravir in cell culture.<sup>46</sup> In the absence of active replication, integrase substitutions at position 50 cannot provide any evolutionary advantage to the virus under dolutegravir pressure, thus the conservation of substitutions at position 50 over time is more likely due to persistent replication under treatment than to redistribution of latently infected cells. The absence of maintenance of R263K could be due to specific fitness costs imparted by this substitution to HIV-1, in agreement with previous reports.<sup>47,48</sup> This again can only be true if HIV-1 undergoes cryptic replicative cycles under DBR, in all likelihood in solid organs or lymph nodes. This in turn may have to do with issues of drug penetration within various organs.<sup>43,49</sup> Why individuals who initiated DBR after VF were the only group not to have emerging variants with drug resistance-associated mutations remains unknown but might also have to do with issues of viral fitness. Alternatively, this could simply be due to the small number of participants in our study. Of note, both R263K and M50I have been recently associated with low levels of resistance to another INSTI termed bictegravir.<sup>50</sup>

Given our results, we suggest an evolutionary pathway for each of our four groups of individuals in Figure 3. Our model is based on the hypothesis that cell trafficking and/or residual replication, associated with a high level of compartmentalization of HIV

reservoirs, are the driving force of genetic diversification in blood-archived HIV quasispecies. On the one hand, individuals treated during AI are at lower risk of generating viral diversity. On the other hand, individuals treated during CI and cases of VF or VS are at higher risk of genetic diversification. In the latter case, residual replication can produce viral diversity while on ART. This suggests that clonal expansion produces no changes in the genetic diversity of viral reservoirs (i.e. AI group),<sup>11-15</sup> whereas residual replication on ART, when it exists, affects HIV-DNA genetic diversity (i.e. CI, VS and VF groups).<sup>14-16</sup> These mechanisms probably co-exist, but replicative- and infective-competent variants seem to preferentially derive from clonally expanded cells.<sup>16</sup>

Our study has several limitations, including the small number of participants and technical issues. We tried to avoid artefact results due to 454 pyrosequencing errors with some controls (duplicate sequencing, Sanger confirmation, sequences cleaning). We cannot exclude a sampling effect for the PBMCs analysed which may not summarize all archived quasispecies, though; by assuming that 454 sequencing errors lead to the same level of background noise in Shannon entropy across samples and across study arms, our results are clear with a marked inflection point in genetic diversity in almost all participants. Moreover, our well-characterized cohort

reflects different clinical and therapeutic stages of HIV infection, but does not allow comparison with other ART regimens. Indeed, whether our observations hold true when other classes of drugs are used needs to be investigated. Comparison with other INSTI-based regimens will also be important.

Initiating a DBR can significantly reduce both HIV RNA and DNA. Concurrently, we observed a dramatic transient reduction of the genetic diversity on both *pol* and *env* genes from archived HIV quasispecies at W4 of treatment. Up to 48 weeks of treatment in our longitudinal follow-up and despite virological suppression in plasma and HIV-DNA level reduction in PBMCs, we observed a slow recovery of the genetic diversity of the reservoirs. Also some viral variants harbouring dolutegravir resistance-associated mutations, including the R263K substitution, were detected in some individuals. These findings show that the HIV reservoir genetic diversity is reshaped following the initiation of a DBR, suggesting the presence of residual replication and/or cell trafficking between the blood compartment and solid tissues.

## Acknowledgements

The results were presented at the Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections, Seattle, WA, USA, 2017 (Abstract 495; Gantner P, Lee GQ, Rey D, Mesplède T, Partisani M, Beck-Wirth G, Fallier J-P, Martinot M, Wainberg M, Fafi-Kremer S. Evolution of archived HIV-1 quasispecies in individuals treated with dolutegravir).

We would like to thank Ruchi M. Newman for 454 error correction and bioinformatics assistance, and Anne Fuchs, Stéphanie Bertsch, Frédéric Jégou and Patricia Fischer for technical assistance.

## Funding

The clinical study was funded by the University Hospital of Strasbourg (Registration number, #2014-5073) and the reagents were funded by both the University Hospital of Strasbourg and the Epidemiology and Applied Medicine Institute (IMEA).

## Transparency declarations

None to declare.

## Supplementary data

Figures S1 and S2 and Table S1 are available as Supplementary data at JAC Online.

## References

- Chun TW, Engel D, Berrey MM et al. Early establishment of a pool of latently infected, resting CD4<sup>+</sup> T cells during primary HIV-1 infection. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; **95**: 8869–73.
- Strain MC, Günthard HF, Havlir DV et al. Heterogeneous clearance rates of long-lived lymphocytes infected with HIV: intrinsic stability predicts lifelong persistence. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; **100**: 4819–24.
- Donahue DA, Wainberg MA. Cellular and molecular mechanisms involved in the establishment of HIV-1 latency. *Retrovirology* 2013; **10**: 11.
- Siliciano JD, Kajdas J, Finzi D et al. Long-term follow-up studies confirm the stability of the latent reservoir for HIV-1 in resting CD4<sup>+</sup> T cells. *Nat Med* 2003; **9**: 727–8.
- Leth S, Schleimann MH, Nissen SK et al. Combined effect of Vacc-4x, recombinant human granulocyte macrophage colony-stimulating factor vaccination, and romidepsin on the HIV-1 reservoir (REDUC): a single-arm, phase 1B/2A trial. *Lancet HIV* 2016; **3**: e463–72.
- Sáez-Cirión A, Bacchus C, Hocqueloux L et al. Post-treatment HIV-1 controllers with a long-term virological remission after the interruption of early initiated antiretroviral therapy ANRS VISCONTI Study. *PLoS Pathog* 2013; **9**: e1003211.
- Gandhi RT, Bosch RJ, Aga E et al. No evidence for decay of the latent reservoir in HIV-1-infected patients receiving intensive enfuvirtide-containing antiretroviral therapy. *J Infect Dis* 2010; **201**: 293–6.
- Brodin J, Zanini F, Thebo L et al. Establishment and stability of the latent HIV-1 DNA reservoir. *Elife* 2016; **5**: e18889.
- Burgard M, Boufassa F, Viard JP et al. Factors influencing peripheral blood mononuclear cell-associated HIV-1 DNA level after long-term suppressive antiretroviral therapy in 236 patients. *AIDS* 2009; **23**: 2165–71.
- Josefsson L, von Stockenström S, Faria NR et al. The HIV-1 reservoir in eight patients on long-term suppressive antiretroviral therapy is stable with few genetic changes over time. *Proc Natl Acad Sci USA* 2013; **110**: E4987–96.
- von Stockenström S, Odevall L, Lee E et al. Longitudinal genetic characterization reveals that cell proliferation maintains a persistent HIV type 1 DNA pool during effective HIV therapy. *J Infect Dis* 2015; **212**: 596–607.
- Chéret A, Bacchus-Souffan C, Avettand-Fenoël V et al. Combined ART started during acute HIV infection protects central memory CD4<sup>+</sup> T cells and can induce remission. *J Antimicrob Chemother* 2015; **70**: 2108–20.
- Katusiime MG, van Zyl GU, Wiegand A et al. No evidence of ongoing replication after 7 years on ART. In: *Abstracts of the Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections, Seattle, WA, USA, 2017*. Abstract 120. Foundation for Retrovirology and Human Health, Alexandria, VA, USA.
- Lorenzo-Redondo R, Fryer HR, Bedford T et al. Persistent HIV-1 replication maintains the tissue reservoir during therapy. *Nature* 2016; **530**: 51–6.
- Gantner P, Morand-Joubert L, Sueur C et al. Drug resistance and tropism as markers of HIV-1 DNA quasispecies in blood cells of heavily pretreated patients who achieved sustained virological suppression. *J Antimicrob Chemother* 2016; **71**: 751–61.
- Lee GQ, Orlova-Fink N, Einkauf K et al. Clonal expansion of genome-intact HIV-1 in functionally polarized Th1 CD4<sup>+</sup> T cells. *J Clin Invest* 2017; **127**: 2689–96.
- Cohn LB, Silva IT, Oliveira TY et al. HIV-1 integration landscape during latent and active infection. *Cell* 2015; **160**: 420–32.
- Osterholzer DA, Goldman M. Dolutegravir: a next-generation integrase inhibitor for treatment of HIV infection. *Clin Infect Dis* 2014; **59**: 265–71.
- Mesplède T, Wainberg MA. Resistance against integrase strand transfer inhibitors and relevance to HIV persistence. *Viruses* 2015; **7**: 3703–18.
- Wainberg MA, Han YS, Mesplède T. Might dolutegravir be part of a functional cure for HIV? *Can J Microbiol* 2016; **62**: 375–82.
- Brenner BG, Wainberg MA. Clinical benefit of dolutegravir in HIV-1 management related to the high genetic barrier to drug resistance. *Virus Res* 2017; **239**: 1–9.
- Buzón MJ, Massanella M, Llibre JM et al. HIV-1 replication and immune dynamics are affected by raltegravir intensification of HAART-suppressed subjects. *Nat Med* 2010; **16**: 460–5.
- Delaugerre C, Charreau I, Braun J et al. Time course of total HIV-1 DNA and 2-long-terminal repeat circles in patients with controlled plasma viremia switching to a raltegravir-containing regimen. *AIDS* 2010; **24**: 2391–5.



- 24** Stephan C, Baldauf HM, Barry J *et al.* Impact of raltegravir on HIV-1 RNA and DNA forms following initiation of antiretroviral therapy in treatment-naïve patients. *J Antimicrob Chemother* 2014; **69**: 2809–18.
- 25** Datta PK, Kaminski R, Hu W *et al.* HIV-1 latency and eradication: past, present and future. *Curr HIV Res* 2016; **14**: 431–41.
- 26** Avettand-Fénoël V, Chaix ML, Blanche S *et al.* LTR real-time PCR for HIV-1 DNA quantitation in blood cells for early diagnosis in infants born to seropositive mothers treated in HAART area (ANRS CO 01). *J Med Virol* 2009; **81**: 217–23.
- 27** Balzer S, Malde K, Jonassen I. Systematic exploration of error sources in pyrosequencing flowgram data. *Bioinformatics* 2011; **27**: i304–9.
- 28** Henn MR, Boutwell CL, Charlebois P *et al.* Whole genome deep sequencing of HIV-1 reveals the impact of early minor variants upon immune recognition during acute infection. *PLoS Pathog* 2012; **8**: e1002529.
- 29** Zhang H, Yang B, Pomerantz RJ *et al.* The cytidine deaminase CEM15 induces hypermutation in newly synthesized HIV-1 DNA. *Nature* 2003; **424**: 94–8.
- 30** Sede MM, Moretti FA, Laufer NL *et al.* HIV-1 tropism dynamics and phylogenetic analysis from longitudinal ultra-deep sequencing data of CCR5- and CXCR4-using variants. *PLoS One* 2014; **9**: e102857.
- 31** Gaudet CE. Review of doing Bayesian data analysis: a tutorial with R, JAGS, and Stan (second edition). *Clin Neuropsychol* 2017; **31**: 1268–70.
- 32** Kijak GH, Sanders-Buell E, Chenine AL *et al.* Rare HIV-1 transmitted/founder lineages identified by deep viral sequencing contribute to rapid shifts in dominant quasispecies during acute and early infection. *PLoS Pathog* 2017; **13**: e1006510.
- 33** Bacchus C, Cheret A, Avettand-Fénoël V *et al.* A single HIV-1 cluster and a skewed immune homeostasis drive the early spread of HIV among resting CD4+ cell subsets within one month post-infection. *PLoS One* 2013; **8**: e64219.
- 34** Zhu T, Wang N, Carr A *et al.* Genetic characterization of human immunodeficiency virus type 1 in blood and genital secretions: evidence for viral compartmentalization and selection during sexual transmission. *J Virol* 1996; **70**: 3098–107.
- 35** Archin NM, Vaidya NK, Kuruc JD *et al.* Immediate antiviral therapy appears to restrict resting CD4+ cell HIV-1 infection without accelerating the decay of latent infection. *Proc Natl Acad Sci USA* 2012; **109**: 9523–8.
- 36** McMichael AJ, Borrow P, Tomaras GD *et al.* The immune response during acute HIV-1 infection: clues for vaccine development. *Nat Rev Immunol* 2010; **10**: 11–23.
- 37** Turnbull EL, Wong M, Wang S *et al.* Kinetics of expansion of epitope-specific T cell responses during primary HIV-1 infection. *J Immunol* 2009; **182**: 7131–45.
- 38** Palmer S, Maldarelli F, Wiegand A *et al.* Low-level viremia persists for at least 7 years in patients on suppressive antiretroviral therapy. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; **105**: 3879–84.
- 39** Bastarache SM, Mesplède T, Donahue DA *et al.* Fitness impaired drug resistant HIV-1 is not compromised in cell-to-cell transmission or establishment of and reactivation from latency. *Viruses* 2014; **6**: 3487–99.
- 40** Chomont N, El-Far M, Ancuta P *et al.* HIV reservoir size and persistence are driven by T cell survival and homeostatic proliferation. *Nat Med* 2009; **15**: 893–900.
- 41** Chavez L, Calvanese V, Verdin E. HIV latency is established directly and early in both resting and activated primary CD4+ T cells. *PLoS Pathog* 2015; **11**: e1004955.
- 42** Anderson JA, Ping LH, Dibben O *et al.* HIV-1 populations in semen arise through multiple mechanisms. *PLoS Pathog* 2010; **6**: e1001053.
- 43** Fletcher CV, Staskus K, Wietgreffe SW *et al.* Persistent HIV-1 replication is associated with lower antiretroviral drug concentrations in lymphatic tissues. *Proc Natl Acad Sci USA* 2014; **111**: 2307–12.
- 44** Quashie PK, Mesplède T, Han YS *et al.* Characterization of the R263K mutation in HIV-1 integrase that confers low-level resistance to the second-generation integrase strand transfer inhibitor dolutegravir. *J Virol* 2012; **86**: 2696–705.
- 45** Cahn P, Pozniak AL, Mingrone H *et al.* Dolutegravir versus raltegravir in antiretroviral-experienced, integrase-inhibitor-naïve adults with HIV: week 48 results from the randomised, double-blind, non-inferiority SAILING study. *Lancet* 2013; **382**: 700–8.
- 46** Wares M, Mesplède T, Quashie PK *et al.* The M50I polymorphic substitution in association with the R263K mutation in HIV-1 subtype B integrase increases drug resistance but does not restore viral replicative fitness. *Retrovirology* 2014; **11**: 7.
- 47** Mesplède T, Quashie PK, Osman N *et al.* Viral fitness cost prevents HIV-1 from evading dolutegravir drug pressure. *Retrovirology* 2013; **10**: 22.
- 48** Mesplède T, Leng J, Pham HT *et al.* The R263K dolutegravir resistance-associated substitution progressively decreases HIV-1 integration. *MBio* 2017; **8**: e00157-17.
- 49** Sanche S, Sheehan N, Mesplède T *et al.* A mathematical model to predict HIV virological failure and elucidate the role of lymph node drug penetration. *CPT Pharmacometrics Syst Pharmacol* 2017; **6**: 469–76.
- 50** Tsiang M, Jones GS, Goldsmith J *et al.* Antiviral activity of bictegravir (GS-9883), a novel potent HIV-1 integrase strand transfer inhibitor with an improved resistance profile. *Antimicrob Agents Chemother* 2016; **60**: 7086–97.

Figure S1. Study flowchart

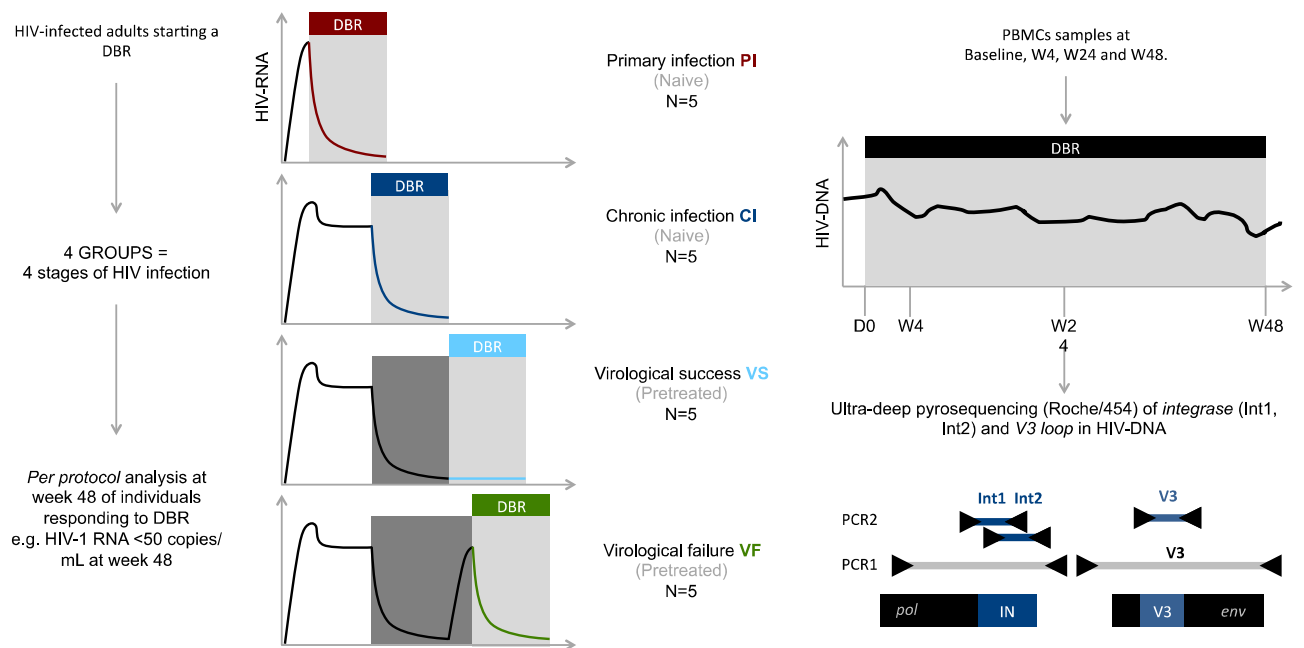


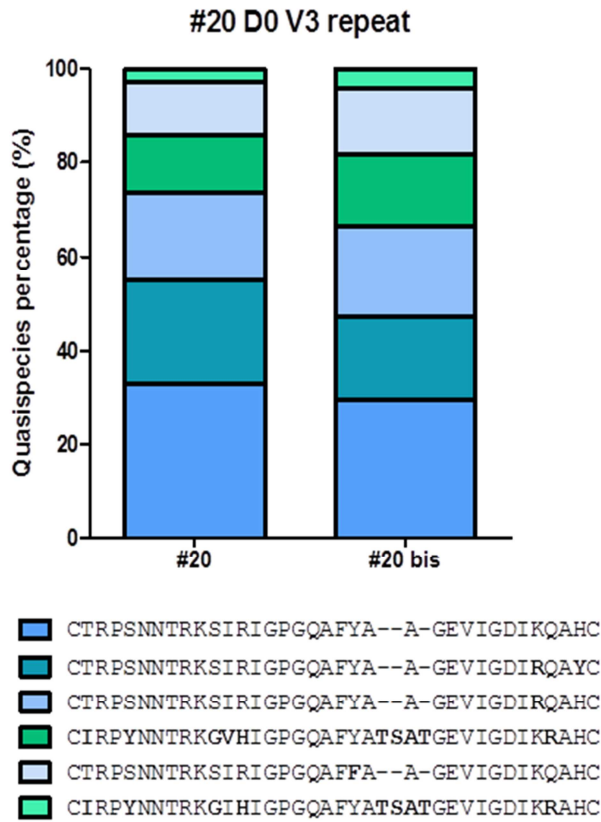
Table S1. Amplicon generation

| For the <i>V3 loop</i> region amplification:  | For the <i>integrase</i> region amplification:   |
|---|--|
| <p>A first-round PCR was performed using the following primers (in 5'-3' orientation):</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Env31, CAGTACAATGTACACA (6955-6973; this and all following positions were based on HIV-1 HXB2, GenBank accession number K03455) and Env8, ATGGGAGGGGCATACATTG (7522-7540).</li> <li>- The first-round PCR was performed as follows: 2 min at 98°C; 10 cycles [30s at 98°C, 30s at 55°C, 90s at 72°C]; 40 cycles [30s at 98°C, 30s at 60°C, 90s + 5s/cycle at 72°C]; 10 min at 72°C followed by cooling to 4°C.</li> </ul> | <p>A first-round PCR was performed using the following primers (in 5'-3' orientation):</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- In12, GCAGGATTCGGGATTAGAAG (4007-4026) and In13, CTTTCTCCTGTATGCAGACC (5251-5270) - With the following conditions: 2 min at 98°C; 10 cycles [30s at 98°C, 30s at 55°C, 90s at 72°C]; 40 cycles [30s at 98°C, 30s at 60°C, 90s + 5s/cycle at 72°C]; 10 min at 72°C followed by cooling to 4°C.</li> </ul>                             |
| <p>Then, a fragment encompassing the V3 region was generated by nested PCR with the following primers:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Env7, AATGGCAGTCTAGCAGAAG (7008-7026) and ED33, TTACAGTAGAAAAATTCCCCTC (7360-7381).</li> </ul>  | <p>Two nested PCR amplicons, Int1 and Int2, encompassing the whole <i>integrase</i> region were generated using the following primers, respectively:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- I1F, AATAGTAGCCAGCTGTGATAAATGTC (4334-4359) and I1R, TGCCATTTGTACTGCTGTCTTAAG (4743-4766);</li> <li>- I2F, GTAAGAGATCAGGCTGAACATC (4722-4743) and I2R, ATGGTGTTTTACTAACTTTTCC (5102-5124) [Mukherjee AIDS 2011; Armenia JID 2012 ; Noguera-Julian VJ 2013].</li> </ul> |
| <p>The nested PCR was performed under the following conditions: 2 min at 98°C; 40 cycles [30s at 98°C, 30s at 55°C, 60s at 72°C]; 10 min at 72°C followed by cooling to 4°C.</p>  |  |

Figure S2 : Controls

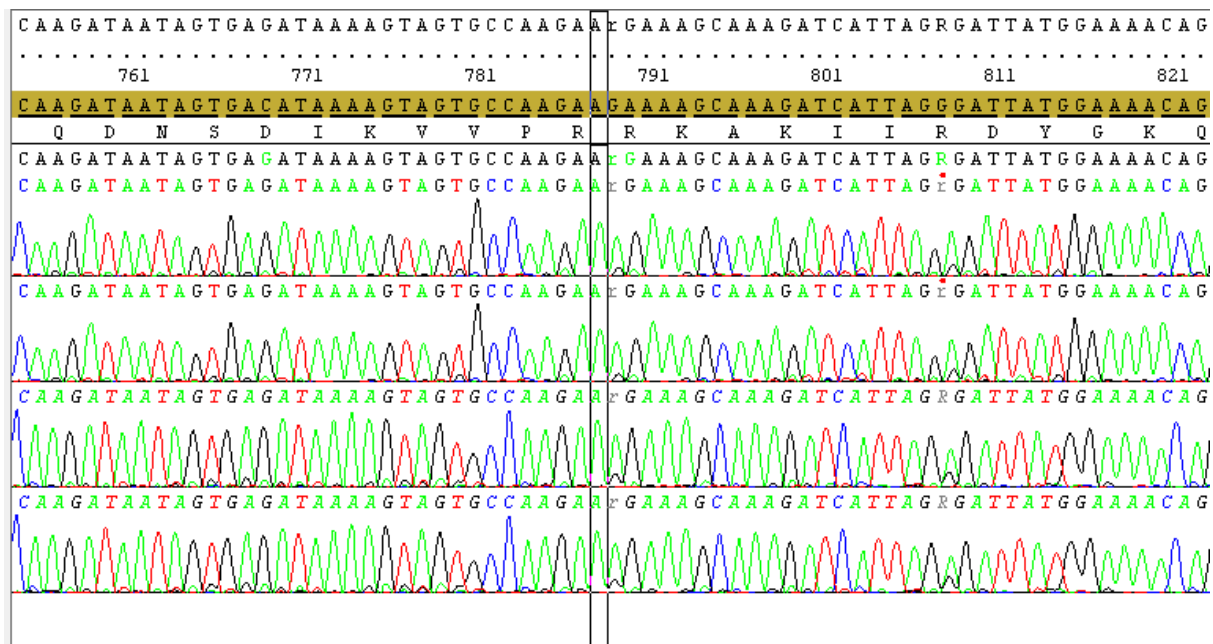
**Part A. 454 re-sequencing**

Sample : Participant #20, Baseline, V3 loop



**Part B. Sanger re-sequencing**

Sample : Participant #9, Week 4, Integrase part 2 (Confirmation of the R263K substitution)



## Conclusions et perspectives

Dans l'objectif d'évaluer les futures stratégies curatives de l'infection à VIH en combinaison avec les traitements antirétroviraux, il est primordial d'approfondir nos connaissances de la dynamique des réservoirs VIH lors de l'utilisation des nouveaux inhibiteurs de l'intégrase. La plus récente de ces molécules, le dolutegravir, n'a pas encore été étudiée dans ce contexte.

Dans l'étude DRONE, chez des personnes initiant un traitement efficace comprenant du dolutegravir pendant 48 semaines, nous avons :

- (1) quantifié l'ADN-VIH dans les cellules mononucléées du sang périphérique, ce qui évalue le réservoir VIH ;
- (2) quantifié plusieurs marqueurs inflammatoires, ce qui reflète l'activation immunitaire résiduelle lors de l'infection à VIH traitée ;
- (3) analysé la dynamique de l'ADN-VIH dans les sous-populations lymphocytaires T CD4+ qui n'ont pas les mêmes demi-vies, ni les mêmes capacités prolifératives, ni les mêmes taux d'infection par des virus intacts, et ne sont donc pas impliquées de la même manière dans la persistance du réservoir VIH ;
- (4) analysé la dynamique des séquences d'ADN-VIH archivées dans les cellules mononucléées du sang périphérique, ce qui permet d'observer l'évolution de la diversité génétique et l'émergence de mutations de résistance sous traitement.

Lors de l'initiation du dolutegravir en **primo-infection**, nous avons observé une baisse des niveaux d'ADN-VIH dans les cellules mononucléées du sang périphérique, mais aussi dans toutes les sous-populations lymphocytaires. En parallèle, une diminution drastique de l'inflammation a été objectivée. Par ailleurs, l'instauration précoce du traitement a permis de stopper et de maintenir un bas niveau d'infection TCM, le réservoir étant essentiellement restreint à l'infection des TTM. Ces dernières ont une demi-vie plus courte que les TCM et sont maintenues par prolifération due à une stimulation antigénique. La présence du réservoir VIH dans les TTM semble donc être un facteur de bon pronostic qui nous permet d'émettre l'hypothèse de l'obtention d'un niveau de réservoir très bas à long terme chez ces personnes. Cette hypothèse est d'ailleurs vérifiée à court terme par un nombre important de participants obtenant un niveau d'ADN-VIH inférieur au seuil de détection dès un an de traitement. De plus, l'instauration précoce du traitement a permis de stopper la diversification de la

quasi-espèce virale archivée. Ceci est également un facteur de bon pronostic qui nous permet d'émettre l'hypothèse d'un moindre risque d'émergence de résistance chez ces personnes dans le futur. L'ensemble de ces données supporte l'idée qu'un traitement antirétroviral initié précocement augmente la probabilité d'atteindre un jour une rémission de l'infection [Saez-Cirion *et al.* 2013 ; Hocqueloux *et al.* 2013 ; Chéret *et al.* 2015].

En initiant le traitement par dolutegravir plus tardivement, lors de **l'infection chronique**, une baisse de l'ADN-VIH et des marqueurs inflammatoires est également observée. Cette baisse est cependant d'intensité plus faible que lors de l'initiation du traitement en primo-infection. De plus, lors de l'infection chronique, ce sont les TCM qui hébergent désormais davantage l'ADN-VIH et l'initiation du traitement ne modifie pas ce paramètre. Avec leur demi-vie longue, la présence du réservoir dans ces cellules est un marqueur de moins bon pronostic et explique une diminution plus lente du niveau de réservoir à l'initiation d'un traitement antirétroviral lors de l'infection chronique. De même, chez ces personnes, la quasi-espèce virale est davantage diversifiée qu'en primo-infection et nous avons noté une inflexion dans cette diversité précocement après l'initiation du traitement par dolutegravir. Cependant, la diversité virale a ensuite ré-augmenté au cours du temps. Ce résultat indique que le dolutegravir n'a pas permis de réduire la diversité virale de façon durable mais a remanié qualitativement le réservoir. Ce remaniement est probablement lié à l'introduction d'une pression de sélection médicamenteuse, comme le montre la sélection d'une mutation R263K chez une participante issue de ce groupe d'individus. L'ensemble de ces données suggère que l'initiation d'un traitement antirétroviral en infection chronique apporte un bénéfice en terme de réservoir et d'activation immunitaire, mais que ce bénéfice est plus modéré que pour le groupe de participants précédent. Ces personnes ont donc une probabilité de rémission post-traitement plus faible que les personnes traitées en primo-infection [Hocqueloux *et al.* 2013].

La mesure de l'ADN-VIH total pour les personnes ayant initié un traitement comprenant du dolutegravir en **succès virologique** n'a pas montré d'effet de réduction de l'ADN-VIH qui est principalement présent dans les TCM. Sur un suivi d'une durée d'un an, on peut donc conclure qu'un switch vers le dolutegravir n'impacte pas les niveaux de réservoir VIH. De façon intéressante, parmi les marqueurs inflammatoires étudiés, seule une baisse du niveau de CD14s, un marqueur d'activation monocyttaire en réponse au LPS, a été observée. De plus, nous avons noté une baisse du taux d'infection des TEM mais pas dans les autres sous-

populations lymphocytaires chez ce groupe de participants. On peut noter deux informations importantes sur les TEM : ces cellules sont le principal réservoir du VIH au niveau du tractus digestif [Yukl *et al.* 2013] et il a récemment été montré que ces cellules hébergent le plus de provirus intacts [Grau-Exposito *et al.* 2017]. L'ensemble de ces résultats suggère un possible effet du dolutegravir au niveau du tractus digestif. On peut émettre l'hypothèse d'une réduction de l'infection, de l'activation et de la prolifération des TEM au niveau digestif sous dolutegravir, ce qui se traduirait par une baisse de l'inflammation au niveau digestif observable par la baisse du CD14s sérique et, en raison de la circulation des cellules entre les compartiments sanguin et digestif, par une baisse du niveau d'infection des TEM sanguins [Sandler *et al.* 2011].

Par ailleurs, et comme pour les personnes traitées lors de l'infection chronique, la diversité génétique de la quasi-espèce virale archivée est élevée avant l'initiation du dolutegravir chez ces personnes. Ceci peut s'expliquer par le fait que la plupart de ces participants ont eux-mêmes été traités en infection chronique. De façon intéressante, une inflexion puis une ré-augmentation de la diversité virale à l'initiation du traitement par dolutegravir sont également observées dans ce groupe d'individus. Nous pouvons donc émettre l'hypothèse d'un remaniement du réservoir VIH et ce, malgré le succès virologique antérieur, dû au changement de pression de sélection médicamenteuse.

Enfin, si le dolutegravir est initié lors d'un **échec virologique**, une baisse de l'ADN-VIH dans les cellules mononucléées du sang périphérique et dans les sous-populations lymphocytaires, et de l'activation immunitaire sont observés. L'ADN-VIH majoritairement distribué dans les TCM et la dynamique de la diversité génétique sont très similaires avec les personnes initiant le traitement par dolutegravir lors de l'infection chronique. Ceci démontre que, chez ces personnes virémiques, la reprise d'un traitement antirétroviral a un impact bénéfique sur le réservoir et l'inflammation. Cependant, les niveaux de réservoir après un an de traitement sont les plus élevés des quatre groupes de participants, ces personnes ne seront donc pas à court terme des candidats potentiels aux premiers essais de stratégies curatives.

L'étude DRONE a plusieurs **limites** que sont l'absence d'un traitement comparateur, issu ou non de la même classe pharmacologique comme le raltegravir, et l'absence d'investigations de réservoirs profonds, comme le tractus digestif. Par ailleurs, l'analyse de la dynamique du réservoir VIH lors d'une interruption thérapeutique programmée, comme réalisée lors de certains essais de traitements curatifs, serait intéressante.

**En concluison**, nos résultats suggèrent une dynamique importante du réservoir viral sous traitement par dolutegravir. L'impact de ce traitement sur le réservoir dépend fortement du stade clinique et thérapeutique à l'initiation du traitement. Les futurs essais portant sur les traitements curatifs devraient inclure des personnes représentant les différents profils de personnes vivant avec le VIH rencontrées en clinique.

Comme mentionné dans les limitations de l'étude DRONE, l'absence de groupe avec traitement comparateur pourrait être évaluée dans de futures études. Par exemple, il serait intéressant de comparer le dolutegravir aux inhibiteurs d'intégrase de première génération comme le raltegravir. De même, l'investigation des compartiments réservoirs profonds est primordiale car ces compartiments représentent autant d'obstacles aux stratégies curatives. Cependant, la réalisation de telles études est limitée par la réalisation de prélèvements invasifs. De plus, il serait important d'évaluer la dynamique du réservoir VIH lors du rebond virologique suite à un arrêt thérapeutique programmé. Cependant, avec la recommandation de traiter toutes les personnes vivant avec le VIH et le bénéfice en terme de morbi/mortalité connu au traitement antirétroviral, il est difficile de réaliser ce genre d'analyse. On peut donc suggérer le passage au modèle d'infection par le SIV chez le macaque rhésus comme analogie de l'infection par le VIH chez l'Homme. À notre connaissance, une étude incluant des macaques va investiguer le réservoir SIV lors de la primo-infection, puis sous traitement par raltegravir ou dolutegravir et à l'arrêt du traitement dans différents compartiments sanctuaires comme le tissu digestif et les ganglions lymphatiques (Dr. Mesplède and Dr. Estaquier, projet CanCURE). Les données de cette étude permettront d'approfondir les résultats acquis lors de l'étude DRONE et ainsi détailler les effets du dolutegravir sur l'établissement de la latence virale.



# Références

---

Abbate I, Rozera G, Giombini E, *et al.* Deep sequencing of plasma and proviral HIV-1 to establish coreceptor usage: what is the clinical impact of the quasispecies distribution? *J Infect Dis* 2011; 204: 971-3.

Achhra A, Mwasakifwa G, Amin J, *et al.* Efficacy and safety of contemporary dual-drug antiretroviral regimens as first-line treatment or as a simplification strategy: a systematic review and meta-analysis. *Lancet HIV* 2016; 3: e351-e360.

Adal M, Ayele W, Wolday D, *et al.* Evidence of genetic variability of human immunodeficiency virus type 1 in plasma and cervicovaginal lavage in ethiopian women seeking care for sexually transmitted infections. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2005; 21: 649-53.

Akil B, Blick G, Hagins DP, *et al.* Dolutegravir versus placebo in subjects harbouring HIV-1 with integrase inhibitor resistance associated substitutions: 48-week results from VIKING-4, a randomized study. *Antivir Ther* 2015; 20: 343-8.

Albin JS, Harris RS. Interactions of host APOBEC3 restriction factors with HIV-1 in vivo: implications for therapeutics. *Expert Rev Mol Med* 2010; 12: e4.

Ambrose Z, Aiken C. HIV-1 uncoating: connection to nuclear entry and regulation by host proteins. *Virology* 2014; 454-455: 371-9.

An P, Winkler CA. Host genes associated with HIV/AIDS: advances in gene discovery. *Trends Genet* 2010; 26: 119-31.

Ananworanich J, Schuetz A, Vandergeeten C, *et al.* Impact of multi-targeted antiretroviral treatment on gut T cell depletion and HIV reservoir seeding during acute HIV infection. *PLoS One* 2012; 7: e33948.

Ananworanich J, Chomont N, Fletcher JL, *et al.* Markers of HIV reservoir size and immune activation after treatment in acute HIV infection with and without raltegravir and maraviroc intensification. *J Virus Erad* 2015; 1: 116-122.

Ananworanich J, Chomont N, Eller LA, *et al.* HIV DNA Set Point is Rapidly Established in Acute HIV Infection and Dramatically Reduced by Early ART. *EBioMedicine* 2016; 11: 68-72.

Anderson JA, Ping L-H, Dibben O, *et al.* HIV-1 Populations in Semen Arise through Multiple Mechanisms. *PLoS Pathog* 2010; 6: e1001053.

Appay V, van Lier RA, Sallusto F, *et al.* Phenotype and function of human T lymphocyte subsets: consensus and issues. *Cytometry A* 2008; 73: 975-83.

Archer J, Rambaut A, Taillon BE, *et al.* The evolutionary analysis of emerging low frequency HIV-1 CXCR4 using variants through time--an ultra-deep approach. *PLoS Comput Biol* 2010; 6: e1001022.

Arribas JR, Horban A, Gerstoft J, *et al.* The MONET trial: darunavir/ritonavir with or without nucleoside analogues, for patients with HIV RNA below 50 copies/ml. *AIDS* 2010; 24: 223-30.

Avettand-Fenoel V, Prazuck T, Hocqueloux L, *et al.* HIV-DNA in rectal cells is well correlated with HIV-DNA in blood in different groups of patients, including long-term non-progressors. *AIDS* 2008; 22: 1880-2.

Avettand-Fènoël V, Chaix ML, Blanche S, *et al.* LTR real-time PCR for HIV-1 DNA quantitation in blood cells for early diagnosis in infants born to seropositive mothers treated in HAART area (ANRS CO 01). *J Med Virol* 2009; 81: 217-23.

Avettand-Fenoel V, Bouteloup V, Mélard A, *et al.* Higher HIV-1 DNA associated with lower gains in CD4 cell count among patients with advanced therapeutic failure receiving optimized treatment (ANRS 123--ETOILE). *J Antimicrob Chemother* 2010; 65: 2212-4.

Avettand-Fenoel V, Hocqueloux L, Muller-Trutwin M, *et al.* Greater diversity of HIV DNA variants in the rectum compared to variants in the blood in patients without HAART. *J Med Virol* 2011; 83: 1499–1507.

Avettand-Fènoël V, Hocqueloux L, Ghosn J, *et al.* Total HIV-1 DNA, a Marker of Viral Reservoir Dynamics with Clinical Implications. *Clin Microbiol Rev* 2016; 29: 859-80.

Avidor B, Girshengorn S, Matus N, *et al.* Evaluation of a benchtop HIV ultradeep pyrosequencing drug resistance assay in the clinical laboratory. *J Clin Microbiol.* 2013; 51: 880-6.

Baatz F, Struck D, Lemaire M, *et al.* Rescue of HIV-1 long-time archived X4 strains to escape maraviroc. *Antiviral Res* 2011; 92: 488-92.

Bacchus C, Cheret A, Avettand-Fenoël V, *et al.* A single HIV-1 cluster and a skewed immune homeostasis drive the early spread of HIV among resting CD4+ cell subsets within one month post-infection. *PLoS One* 2013; 8: e64219.

Baker JV, Henry WK, Patel P, *et al.* Progression of carotid intima-media thickness in a contemporary human immunodeficiency virus cohort. *Clin Infect Dis* 2011; 53: 826-35.

Barouch DH, Deeks SG. Immunologic strategies for HIV-1 remission and eradication. *Science.* 2014; 345: 169-74.

Barton K, Winckelmann A, Palmer S. HIV-1 Reservoirs During Suppressive Therapy. *Trends Microbiol* 2016; 24: 345-55.

Bavinger C, Bendavid E, Niehaus K, *et al.* Risk of cardiovascular disease from antiretroviral therapy for HIV: a systematic review. *PLoS One* 2013; 8: e59551.

Bell NM, Lever AM. HIV Gag polyprotein: processing and early viral particle assembly. *Trends Microbiol* 2013; 21: 136-44.

Bernard-Stoecklin S, Gommet C, Corneau AB, *et al.* Semen CD4+ T cells and macrophages are productively infected at all stages of SIV infection in macaques. *PLoS Pathog* 2013; 9: e1003810.

Bernardini C, Maggiolo F. Triple-combination rilpivirine, emtricitabine, and tenofovir (Complera™/Eviplera™) in the treatment of HIV infection. *Patient Prefer Adherence* 2013; 7: 531-42.

Bernstein HB, Wang G, Plasterer MC, *et al.* CD4+ NK cells can be productively infected with HIV, leading to downregulation of CD4 expression and changes in function. *Virology* 2009; 387: 59-66.

Birkus G, Hitchcock MJ, Cihlar T. Assessment of mitochondrial toxicity in human cells treated with tenofovir: comparison with other nucleoside reverse transcriptase inhibitors. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46: 716-23.

Blanco JL, Varghese V, Rhee SY, *et al.* HIV-1 integrase inhibitor resistance and its clinical implications. *J Infect Dis* 2011; 203: 1204-14.

Boender TS, Kityo CM, Boerma RS, *et al.* Accumulation of HIV-1 drug resistance after continued virological failure on first-line ART in adults and children in sub-Saharan Africa. *J Antimicrob Chemother* 2016; 71: 2918-27

Bomsel M, Ganor Y, Sennepin A, *et al.* Tissue macrophages are a major viral reservoir in male urethra of HIV-1-infected individuals under suppressive antiretroviral therapy. International Workshop on HIV persistence during therapy. December 12-15, 2017, Miami, FL. Abstract OP 4.4

Bon I, Turriziani O, Musumeci G, *et al.* HIV-1 coreceptor usage in paired plasma RNA and proviral DNA from patients with acute and chronic infection never treated with antiretroviral therapy. *J Med Virol* 2015; 87: 315-22.

Borzy MS, Connell RS, Kiessling AA. Detection of human immunodeficiency virus in cell-free seminal fluid. *J Acquir Immune Defic Syndr* 1988; 1: 419-24.

Boutet A, Salim H, Taoufik Y, *et al.* Isolated human astrocytes are not susceptible to infection by M- and T-tropic HIV-1 strains despite functional expression of the chemokine receptors CCR5 and CXCR4. *Glia* 2001; 34: 165-77.

Brenchley JM, Hill BJ, Ambrozak DR, *et al.* T-cell subsets that harbor human immunodeficiency virus (HIV) in vivo: implications for HIV pathogenesis. *J Virol* 2004; 78: 1160-8.

Bruner KM, Murray AJ, Pollack RA, *et al.* Defective proviruses rapidly accumulate during acute HIV-1 infection. *Nat Med* 2016; 22: 1043-9.

Bull M, Learn G, Genowati I, *et al.* Compartmentalization of HIV-1 within the female genital tract is due to monotypic and low-diversity variants not distinct viral populations. *PLoS One* 2009; 4: e7122.

Bull ME, Heath LM, McKernan-Mullin JL, *et al.* Human immunodeficiency viruses appear compartmentalized to the female genital tract in cross-sectional analyses but genital lineages do not persist over time. *J Infect Dis* 2013; 207: 1206-15.

Butler DM, Delpont W, Kosakovsky Pond SL, *et al.* The origins of sexually transmitted HIV among men who have sex with men. *Sci Transl Med* 2010; 2: 18re1.

Buzón MJ, Massanella M, Llibre JM, *et al.* HIV-1 replication and immune dynamics are affected by raltegravir intensification of HAART-suppressed subjects. *Nat Med* 2010; 16: 460-5.

Cahn P, Pozniak AL, Mingrone H, *et al.* Dolutegravir versus raltegravir in antiretroviral-experienced, integrase-inhibitor-naive adults with HIV: week 48 results from the randomised, double-blind, non-inferiority SAILING study. *Lancet* 2013; 382: 700-8.

Carias AM, McCoombe S, McRaven M, *et al.* Defining the interaction of HIV-1 with the mucosal barriers of the female reproductive tract. *J Virol* 2013; 87: 11388-400.

Carlson JM, Schaefer M, Monaco DC, *et al.* HIV transmission. Selection bias at the heterosexual HIV-1 transmission bottleneck. *Science* 2014; 345: 1254031.

Castagna A, Maggiolo F, Penco G *et al.* Dolutegravir in antiretroviral-experienced patients with raltegravir- and/or elvitegravir-resistant HIV-1: 24-week results of the phase III VIKING-3 study. *J Infect Dis* 2014; 210: 354-62.

Chaillon A, Smith DM, Vanpouille C, *et al.* HIV Trafficking Between Blood and Semen During Early Untreated HIV Infection. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2017; 74: 95-102.

Chaix ML, Boufassa F, Meyzer C, *et al.* Detectable HIV-RNA in semen of HIV controllers. *PLoS One* 2017; 12: e0183376.

Charpentier C, Joly V, Ghosn J, *et al.* Change in HIV-1 DNA tropism despite virological success in patients receiving an enfuvirtide-based regimen. *J Antimicrob Chemother* 2014; 69: 2588-90.

Charpentier C, Lee GQ, Rodriguez C, *et al.* Highly frequent HIV-1 minority resistant variants at baseline of the ANRS 139 TRIO trial had a limited impact on virological response. *J Antimicrob Chemother* 2015; 70: 2090-6.

Chen X, Tsiang M, Yu F, *et al.* Modeling, analysis, and validation of a novel HIV integrase structure provide insights into the binding modes of potent integrase inhibitors. *J Mol Biol* 2008; 380: 504-19.

Cheng CY, Mruk DD. The blood-testis barrier and its implications for male contraception. *Pharmacol Rev* 2012; 64: 16-64.

Chéret A, Nembot G, Mélard A, *et al.* Intensive five-drug antiretroviral therapy regimen versus standard triple-drug therapy during primary HIV-1 infection (OPTIPRIM-ANRS 147): a randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet Infect Dis* 2015; 15: 387-96.

Chéret A, Bacchus-Souffan C, Avettand-Fenoël V, *et al.* Combined ART started during acute HIV infection protects central memory CD4<sup>+</sup> T cells and can induce remission. *J Antimicrob Chemother* 2015; 70: 2108-20.

Chéret A, Durier C, Mélard A, *et al.* Impact of early cART on HIV blood and semen compartments at the time of primary infection. *PLoS One* 2017; 12: e0180191.

Choudhury B, Pillay D, Taylor S, *et al.* Analysis of HIV-1 variation in blood and semen during treatment and treatment interruption. *J Med Virol* 2002; 68: 467–472.

Chun TW, Engel D, Berrey MM, *et al.* Early establishment of a pool of latently infected, resting CD4(+) T cells during primary HIV-1 infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95: 8869-73.

Chun TW, Nickle DC, Justement JS, *et al.* HIV-infected individuals receiving effective antiviral therapy for extended periods of time continually replenish their viral reservoir. *J Clin Invest* 2005; 115: 3250–3255.

Chun T-W, Nickle DC, Justement JS, *et al.* Persistence of HIV in gut-associated lymphoid tissue despite long-term antiretroviral therapy. *J Infect Dis* 2008; 197: 714–720.

Chun TW, Fauci AS. HIV reservoirs: pathogenesis and obstacles to viral eradication and cure. *AIDS* 2012; 26: 1261-8.

Claiborne DT, Prince JL, Scully E, *et al.* Replicative fitness of transmitted HIV-1 drives acute immune activation, proviral load in memory CD4<sup>+</sup> T cells, and disease progression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2015; 112: E1480-9.

Clarridge KE, Blazkova J, Einkauf K, *et al.* Effect of analytical treatment interruption and reinitiation of antiretroviral therapy on HIV reservoirs and immunologic parameters in infected individuals. *PLoS Pathog* 2018; 14: e1006792.

Clotet B, Feinberg J, van Lunzen J, *et al.* Once-daily dolutegravir versus darunavir plus ritonavir in antiretroviral-naive adults with HIV-1 infection (FLAMINGO): 48 week results from the randomised open-label phase 3b study. *Lancet* 2014; 383: 2222-31.

Cockerham LR, Siliciano JD, Sinclair E, *et al.* CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cell activation are associated with HIV DNA in resting CD4<sup>+</sup> T cells. *PLoS One* 2014; 9: e110731.

Coffin JM. HIV population dynamics in vivo: implications for genetic variation, pathogenesis, and therapy. *Science* 1995; 267: 483-9.

Cohen MS, Shaw GM, McMichael AJ, *et al.* Acute HIV-1 Infection. *N Engl J Med* 2011; 364: 1943-54.

Cohn LB, Silva IT, Oliveira TY, *et al.* HIV-1 integration landscape during latent and active infection. *Cell* 2015; 160: 420-32.

Cooper A, García M, Petrovas C, *et al.* HIV-1 causes CD4 cell death through DNA-dependent protein kinase during viral integration. *Nature* 2013; 498: 376-9.

Costiniuk CT, Kovacs C, Routy J-P, *et al.* Short communication: human immunodeficiency virus rebound in blood and seminal plasma following discontinuation of antiretroviral therapy. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2013; 29: 266–269.

Cozzi-Lepri A, Noguera-Julian M, Di Giallonardo F, *et al.* Low-frequency drug-resistant HIV-1 and risk of virological failure to first-line NNRTI-based ART: a multicohort European



case-control study using centralized ultrasensitive 454 pyrosequencing. *J Antimicrob Chemother* 2015; 70: 930-40.

Craigie R. The molecular biology of HIV integrase. *Future Virol* 2012; 7: 679-686.

Craigie R, Bushman FD. HIV DNA integration. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2012; 2: a006890.

Crowell TA, Fletcher JL, Sereti I, *et al.* Initiation of antiretroviral therapy before detection of colonic infiltration by HIV reduces viral reservoirs, inflammation and immune activation. *J Int AIDS Soc* 2016; 19: 21163.

Cu-Uvin S, Snyder B, Harwell JI, *et al.* Association between paired plasma and cervicovaginal lavage fluid HIV-1 RNA levels during 36 months. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2006; 42: 584-7.

Cuzin L, Pugliese P, Sauné K, *et al.* Levels of intracellular HIV-DNA in patients with suppressive antiretroviral therapy. *AIDS* 2015; 29: 1665-71.

Danner SA, Carr A, Leonard JM, *et al.* A short-term study of the safety, pharmacokinetics, and efficacy of ritonavir, an inhibitor of HIV-1 protease. European-Australian Collaborative Ritonavir Study Group. *N Engl J Med* 1995; 333: 1528-33.

Däumer M, Kaiser R, Klein R, *et al.* Genotypic tropism testing by massively parallel sequencing: qualitative and quantitative analysis. *BMC Med Inform Decis Mak* 2011; 11: 30.

De Pasquale MP, Leigh Brown AJ, Uvin SC, *et al.* Differences in HIV-1 pol sequences from female genital tract and blood during antiretroviral therapy. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2003; 34: 37-44.

Delaugerre C, Morand-Joubert L, Chaix ML, *et al.* Persistence of multidrug-resistant HIV-1 without antiretroviral treatment 2 years after sexual transmission. *Antivir Ther* 2004; 9: 415-

21.

Delaugerre C, Charreau I, Braun J, *et al.* Time course of total HIV-1 DNA and 2-long-terminal repeat circles in patients with controlled plasma viremia switching to a raltegravir-containing regimen. *AIDS* 2010; 24: 2391-5.

Delaugerre C, Braun J, Charreau I, *et al.* Comparison of resistance mutation patterns in historical plasma HIV RNA genotypes with those in current proviral HIV DNA genotypes among extensively treated patients with suppressed replication. *HIV Med* 2012; 13: 517-25

Deleage C, Moreau M, Rioux-Leclercq N, *et al.* Human immunodeficiency virus infects human seminal vesicles in vitro and in vivo. *Am J Pathol* 2011; 179: 2397-408.

Deleage C, Schuetz A, Alvord WG, *et al.* Impact of early cART in the gut during acute HIV infection. *JCI Insight* 2016; 1: e87065.

Delobel P, Saliou A, Nicot F, *et al.* Minor HIV-1 variants with the K103N resistance mutation during intermittent efavirenz-containing antiretroviral therapy and virological failure. *PLoS One* 2011; 6: e21655.

Dezzutti CS, Hladik F. Use of human mucosal tissue to study HIV-1 pathogenesis and evaluate HIV-1 prevention modalities. *Curr HIV/AIDS Rep* 2013; 10: 12-20.

Donahue DA, Wainberg MA. Cellular and molecular mechanisms involved in the establishment of HIV-1 latency. *Retrovirology* 2013; 10: 11.

Draughon JE. Sexual assault injuries and increased risk of HIV transmission. *Adv Emerg Nurs J.* 2012; 34: 82-7.

Duval X, Baron G, Garelik D, *et al.* Living with HIV, antiretroviral treatment experience and tobacco smoking: results from a multisite cross-sectional study. *Antivir Ther* 2008; 13: 389-97.

El-Sadr WM, Lundgren J, Neaton JD, *et al.* CD4+ count-guided interruption of antiretroviral treatment. *N Engl J Med* 2006; 355: 2283-96.

Engelman A, Cherepanov P. The lentiviral integrase binding protein LEDGF/p75 and HIV-1 replication. *PLoS Pathog* 2008; 4: e1000046.

Eriksson S, Graf EH, Dahl V, *et al.* Comparative analysis of measures of viral reservoirs in HIV-1 eradication studies. *PLoS Pathog* 2013; 9: e1003174.

Eron JJ, Young B, Cooper DA, *et al.* Switch to a raltegravir-based regimen versus continuation of a lopinavir-ritonavir-based regimen in stable HIV-infected patients with suppressed viraemia (SWITCHMRK 1 and 2): two multicentre, double-blind, randomised controlled trials. *Lancet* 2010; 375: 396-407.

Estes JD, Kityo C, Ssali F, *et al.* Defining total-body AIDS-virus burden with implications for curative strategies. *Nat Med* 2017; 23: 1271-1276.

Evering TH, Mehandru S, Racz P, *et al.*: Absence of HIV-1 evolution in the gut-associated lymphoid tissue from patients on combination antiviral therapy initiated during primary infection. *PLoS Pathog* 2012; 8: e1002506.

Falasca F, Montagna C, Maida P, *et al.* Analysis of intracellular human immunodeficiency virus (HIV)-1 drug resistance mutations in multi-failed HIV-1-infected patients treated with a salvage regimen: 72-week follow-up. *Clin Microbiol Infect* 2013; 19: E318-21.

Fernández-Caballero JA, Chueca N, Alvarez M, *et al.* Use of deep sequencing data for routine analysis of HIV resistance in newly diagnosed patients. *J Int AIDS Soc* 2014; 17: 19748.

Fidler S, Porter K, Ewings F, *et al.* Short-course antiretroviral therapy in primary HIV infection. *N Engl J Med* 2013, 368: 207-217.

Finzi D, Blankson J, Siliciano JD, *et al.* Latent infection of CD4<sup>+</sup> T cells provides a mechanism for lifelong persistence of HIV-1, even in patients on effective combination therapy. *Nat Med* 1999; 5: 512-7.

Fisher R, van Zyl GU, Travers SA, *et al.* Deep sequencing reveals minor protease resistance mutations in patients failing a protease inhibitor regimen. *J Virol* 2012; 86: 6231-7.

Foster JL, Garcia JV. HIV-1 Nef: at the crossroads. *Retrovirology* 2008; 5: 84.

Frost SD, Dumaurier MJ, Wain-Hobson S, *et al.* Genetic drift and within-host metapopulation dynamics of HIV-1 infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98: 6975-80.

Ganor Y, Zhou Z, Bodo J, *et al.* The adult penile urethra is a novel entry site for HIV-1 that preferentially targets resident urethral macrophages. *Mucosal Immunol* 2013; 6: 776-86

Gantner P, Riegel L, Reinhart S, *et al.* Attentes des personnes vivant avec le VIH en 2013 : la difficulté dans le regard de l'autre. *La revue francophone internationale de recherche infirmière* 2015; 2: 79-89.

Gantner P, Morand-Joubert L, Sueur C, *et al.* Drug resistance and tropism as markers of the dynamics of HIV-1 DNA quasispecies in blood cells of heavily pretreated patients who achieved sustained virological suppression. *J Antimicrob Chemother* 2016; 71: 751-61.

Gantner P, Assoumou L, Leruez-Ville M, *et al.* HIV-1-RNA in seminal plasma correlates with detection of HIV-1-DNA in semen cells, but not with CMV shedding, among MSM on successful antiretroviral regimens. *J Antimicrob Chemother* 2016; 71: 3202–3205.

Gantner P, Mélard A, Damond F, *et al.* Interlaboratory quality control of total HIV-1 DNA load measurement for multicenter reservoir studies. *J Med Virol* 2017; 89: 2047-2050.

Gantner P, Ghosn J. Genital reservoir: a barrier to functional cure? *Curr Opin HIV AIDS* 2018 (in press).

Geijtenbeek TB, Kwon DS, Torensma R, *et al.* DC-SIGN, a dendritic cell-specific HIV-1-binding protein that enhances trans-infection of T cells. *Cell* 2000; 100: 587-97.

Ghosn J, Viard JP, Katlama C, *et al.* Evidence of genotypic resistance diversity of archived and circulating viral strains in blood and semen of pre-treated HIV-infected men. *AIDS* 2004; 18: 447-57.

Ghosn J, Wirden M, Ktorza N, *et al.* No benefit of a structured treatment interruption based on genotypic resistance in heavily pretreated HIV-infected patients. *AIDS* 2005; 19: 1643-7.

Ghosn J, Pellegrin I, Goujard C, *et al.* HIV-1 resistant strains acquired at the time of primary infection massively fuel the cellular reservoir and persist for lengthy periods of time. *AIDS* 2006; 20: 159-70.

Ghosn J, Galimand J, Raymond S, *et al.* X4 tropic multi-drug resistant quasi-species detected at the time of primary HIV-1 infection remain exclusive or at least dominant far from PHI. *PLoS One* 2011; 6: e23301.

Ghosn J, Leruez-Ville M, Blanche J, *et al.* HIV-1 DNA levels in peripheral blood mononuclear cells and cannabis use are associated with intermittent HIV shedding in semen of men who have sex with men on successful antiretroviral regimens. *Clin Infect Dis* 2014; 58: 1763–1770.

Ghosn J, Palich R, Chaillon A, *et al.* Viral rebound in semen after treatment interruption in a HIV therapeutic vaccine double-blind trial (VRI02/ANRS149-LIGHT). International AIDS Society conference on HIV science. July 23-26, 2017, Paris, France. Abstract TUPDB0105

Gianella S, Richman DD. Minority variants of drug-resistant HIV. *J Infect Dis* 2010; 202: 657-66.

Gianella S, Anderson CM, Vargas MV, *et al.* Cytomegalovirus DNA in semen and blood is associated with higher levels of proviral HIV DNA. *J Infect Dis* 2013; 207: 898-902.

Gianella S, Massanella M, Richman DD, *et al.* Cytomegalovirus replication in semen is associated with higher levels of proviral HIV DNA and CD4+ T cell activation during antiretroviral treatment. *J Virol* 2014; 88: 7818-27.

Gillette MA, Shah BM, Schafer JJ, *et al.* Dolutegravir: A New Integrase Strand Transfer Inhibitor for the Treatment of HIV - An Alternative Viewpoint. *Pharmacotherapy*. 2014; 34: e173-4.

Goujard C, Bonarek M, Meyer L, *et al.* CD4 cell count and HIV DNA level are independent predictors of disease progression after primary HIV type 1 infection in untreated patients. *Clin Infect Dis* 2006; 42: 709-15.

Grau-Expósito J, Serra-Peinado C, Miguel L, *et al.* A Novel Single-Cell FISH-Flow Assay Identifies Effector Memory CD4+ T cells as a Major Niche for HIV-1 Transcription in HIV-Infected Patients. *MBio*. 2017; 8: e00876-17.

Grunfeld C, Pang M, Doerrler W, *et al.* Lipids, lipoproteins, triglyceride clearance, and cytokines in human immunodeficiency virus infection and the acquired immunodeficiency syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 1992; 74: 1045-52.

Guadalupe M, Reay E, Sankaran S, *et al.* Severe CD4+ T-cell depletion in gut lymphoid tissue during primary human immunodeficiency virus type 1 infection and substantial delay in restoration following highly active antiretroviral therapy. *J Virol* 2003; 77: 11708-17.

Gupta SK, Mi D, Moe SM, *et al.* Effects of switching from efavirenz to raltegravir on endothelial function, bone mineral metabolism, inflammation, and renal function: a randomized, controlled trial. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2013; 64: 279-83.

Gutierrez-Valencia A, Benmarzouk-Hidalgo OJ, Rivas-Jeremías I, *et al.* Viral Kinetics in Semen With Different Antiretroviral Families in Treatment-Naive Human Immunodeficiency Virus-Infected Patients: A Randomized Trial. *Clin Infect Dis* 2017; 65: 551-556.

Haaland RE, Sullivan ST, Evans-Strickfaden T, *et al.* Female genital tract shedding of CXCR4-tropic HIV Type 1 is associated with a majority population of CXCR4-tropic HIV Type 1 in blood and declining CD4(+) cell counts. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2012; 28: 1524-32.

Haase AT. Early events in sexual transmission of HIV and SIV and opportunities for interventions. *Annu Rev Med* 2011; 62: 127-39.

Haim H, Salas I, Sodroski J. Proteolytic processing of the human immunodeficiency virus envelope glycoprotein precursor decreases conformational flexibility. *J Virol* 2013; 87: 1884-9.

Halvas EK, Aldrovandi GM, Balfe P, *et al.* Blinded, multicenter comparison of methods to detect a drug-resistant mutant of human immunodeficiency virus type 1 at low frequency. *J Clin Microbiol* 2006; 44: 2612-4.

Hedskog C, Mild M, Jernberg J, *et al.* Dynamics of HIV-1 quasispecies during antiviral treatment dissected using ultra-deep pyrosequencing. *PLoS One* 2010; 5: e11345.

Henn A, Flateau C, Gallien S. Primary HIV Infection: Clinical Presentation, Testing, and Treatment. *Curr Infect Dis Rep* 2017; 19: 37.

Ho YC, Shan L, Hosmane NN, Wang J, *et al.* Replication-competent noninduced proviruses in the latent reservoir increase barrier to HIV-1 cure. *Cell* 2013; 155: 540-51.

Hocqueloux L, Avettand-Fènoël V, Jacquot S, *et al.* Long-term antiretroviral therapy initiated during primary HIV-1 infection is key to achieving both low HIV reservoirs and normal T cell counts. *J Antimicrob Chemother* 2013; 68: 1169-78.

Hong JJ, Amancha PK, Rogers KA, *et al.* Early lymphoid responses and germinal center formation correlate with lower viral load set points and better prognosis of simian immunodeficiency virus infection. *J Immunol* 2014; 193: 797-806.

Hu WS, Hughes SH. HIV-1 reverse transcription. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2012; 2.

Imamichi H, Dewar RL, Adelsberger JW, *et al.* Defective HIV-1 proviruses produce novel protein-coding RNA species in HIV-infected patients on combination antiretroviral therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2016; 113: 8783-8.

Imamichi H, DeGray G, Dewar RL, *et al.*: Lack of compartmentalization of HIV-1 quasispecies between the gut and peripheral blood compartments. *J Infect Dis* 2011; 204:309–314.

Iversen AK, Attermann J, Gerstoft J, *et al.* Longitudinal and cross-sectional studies of HIV-1 RNA and DNA loads in blood and the female genital tract. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2004; 117: 227-35.

Iwabu Y, Fujita H, Kinomoto M, *et al.* HIV-1 accessory protein Vpu internalizes cell-surface BST-2/tetherin through transmembrane interactions leading to lysosomes. *J Biol Chem* 2009; 284: 35060-72.

Johnstone FD, Williams AR, Bird GA, *et al.* Immunohistochemical characterization of endometrial lymphoid cell populations in women infected with human immunodeficiency virus. *Obstet Gynecol* 1994; 83: 586-93.

Josefsson L, von Stockenstrom S, Faria NR, *et al.* The HIV-1 reservoir in eight patients on long-term suppressive antiretroviral therapy is stable with few genetic changes over time. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013; 110: E4987-96.

Kahn JO, Walker BD. Acute human immunodeficiency virus type 1 infection. *N Engl J Med* 1998; 339: 33-9.

Kakuda TN, Brundage RC, Anderson PL, *et al.* Nucleoside reverse transcriptase inhibitor-induced mitochondrial toxicity as an etiology for lipodystrophy. *AIDS* 1999; 13: 2311-2.



Kalichman SC, Di Berto G, Eaton L. Human immunodeficiency virus viral load in blood plasma and semen: review and implications of empirical findings. *Sex Transm Dis* 2008; 35: 55–60.

Kanters S, Vitoria M, Doherty M, *et al.* Comparative efficacy and safety of first-line antiretroviral therapy for the treatment of HIV infection: a systematic review and network meta-analysis. *Lancet HIV* 2016; 3: e510-e520.

Karn J, Stoltzfus CM. Transcriptional and posttranscriptional regulation of HIV-1 gene expression. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2012; 2: a006916.

Katlama C, Assoumou L, Valantin MA, *et al.* Maraviroc plus raltegravir failed to maintain virological suppression in HIV-infected patients with lipohypertrophy: results from the ROCnRAL ANRS 157 study. *J Antimicrob Chemother* 2014; 69: 1648-52.

Keele BF, Giorgi EE, Salazar-Gonzalez JF, *et al.* Identification and characterization of transmitted and early founder virus envelopes in primary HIV-1 infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105: 7552-7.

Kelley CF, Haaland RE, Patel P, *et al.*: HIV-1 RNA rectal shedding is reduced in men with low plasma HIV-1 RNA viral loads and is not enhanced by sexually transmitted bacterial infections of the rectum. *J Infect Dis* 2011; 204: 761–767.

Kessl JJ, McKee CJ, Eidahl JO, *et al.* HIV-1 Integrase-DNA Recognition Mechanisms. *Viruses* 2009; 1: 713-36.

Kiviat NB, Critchlow CW, Hawes SE, *et al.*: Determinants of human immunodeficiency virus DNA and RNA shedding in the anal-rectal canal of homosexual men. *J Infect Dis* 1998; 177: 571–578.

Klatt NR, Bosinger SE, Peck M, *et al.* Limited HIV infection of central memory and stem cell memory CD4+ T cells is associated with lack of progression in viremic individuals. *PLoS Pathog* 2014; 10: e1004345.

Klein K, Nickel G, Nankya I, *et al.* Higher sequence diversity in the vaginal tract than in blood at early HIV-1 infection. *PLoS Pathog* 2018; 14: e1006754.

King CC, Ellington SR, Davis NL, *et al.* Prevalence, Magnitude, and Correlates of HIV-1 Genital Shedding in Women on Antiretroviral Therapy. *J Infect Dis* 2017; 216: 1534-1540.

Koelsch KK, Liu L, Haubrich R, *et al.* Dynamics of total, linear nonintegrated, and integrated HIV-1 DNA in vivo and in vitro. *J Infect Dis* 2008; 197: 411-9.

Koelsch KK, Boesecke C, McBride K, *et al.* Impact of treatment with raltegravir during primary or chronic HIV infection on RNA decay characteristics and the HIV viral reservoir. *AIDS* 2011; 25: 2069-78.

Komninakis SV, Santos DE, Santos C, *et al.* HIV-1 proviral DNA loads (as determined by quantitative PCR) in patients subjected to structured treatment interruption after antiretroviral therapy failure. *J Clin Microbiol* 2012; 50: 2132-3.

Kovacs A, Wasserman SS, Burns D, *et al.* Determinants of HIV-1 shedding in the genital tract of women. *Lancet* 2001; 358: 1593-601.

Krieger JN, Nirapathpongporn A, Chaiyaporn M, *et al.* Vasectomy and human immunodeficiency virus type 1 in semen. *J Urol* 1998; 159: 820-6.

Laanani M, Ghosn J, Essat A, *et al.* Impact of the Timing of Initiation of Antiretroviral Therapy During Primary HIV-1 Infection on the Decay of Cell-Associated HIV-DNA. *Clin Infect Dis* 2015; 60: 1715-21.

Lafeuillade A, Solas C, Halfon P, *et al.* Differences in the detection of three HIV-1 protease inhibitors in non-blood compartments: clinical correlations. *HIV Clin Trials* 2002; 3: 27-35.

Laguet N, Brégnard C, Hue P, *et al.* Premature activation of the SLX4 complex by Vpr promotes G2/M arrest and escape from innate immune sensing. *Cell* 2014; 156: 134-45.

Lai SK, Hida K, Shukair S, *et al.* Human immunodeficiency virus type 1 is trapped by acidic but not by neutralized human cervicovaginal mucus. *J Virol* 2009; 83: 11196-200.

Lake JE, McComsey GA, Hulgand T, *et al.* Switch to raltegravir decreases soluble CD14 in virologically suppressed overweight women: the Women, Integrase and Fat Accumulation Trial. *HIV Med* 2014; 15: 431-41

Lake J, Currier JS, Koteff J *et al.* Cardiovascular Biomarkers After Switch to ABC/DTG/3TC: The STRIVING Study. Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections. February 22–25, 2016, Boston, MA. Abstract 660.

Lam YM, McBride KL, Amin J, *et al.* Switching virally suppressed, treatment-experienced patients to a raltegravir-containing regimen does not alter levels of HIV-1 DNA. *PLoS One*. 2012; 7: e31990.

Lambotte O, Chaix ML, Gubler B, *et al.* The lymphocyte HIV reservoir in patients on long-term HAART is a memory of virus evolution. *AIDS* 2004; 18: 1147-58.

Landay A, Golub ET, Desai S, *et al.* HIV RNA levels in plasma and cervical-vaginal lavage fluid in elite controllers and HAART recipients. *AIDS* 2014; 28: 739-43.

Lang S, Mary-Krause M, Cotte L, *et al.* Increased risk of myocardial infarction in HIV-infected patients in France, relative to the general population. *AIDS* 2010; 24: 1228-30.

Laskey SB, Siliciano RF. A mechanistic theory to explain the efficacy of antiretroviral therapy. *Nat Rev Microbiol*. 2014; 12: 772-80.

Launay O, Tod M, Tschöpe I, *et al.* Residual HIV-1 RNA and HIV-1 DNA production in the genital tract reservoir of women treated with HAART: the prospective ANRS EP24 GYNODYN study. *Antivir Ther* 2011; 16: 843-52.

Lê MP, Belarbi L, Chaix ML, *et al.* Penetration and antiviral efficacy of total and unbound

maraviroc, raltegravir and rilpivirine in both female and male genital fluids from HIV-positive patients receiving regimens containing these antiretrovirals. *J Antimicrob Chemother* 2017; 72: 3167-3171.

Le T, Chiarella J, Simen BB, *et al.* Low-abundance HIV drug-resistant viral variants in treatment-experienced persons correlate with historical antiretroviral use. *PLoS One* 2009; 4: e6079.

Le Tortorec A, Satie AP, Denis H, *et al.* Human prostate supports more efficient replication of HIV-1 R5 than X4 strains *ex vivo*. *Retrovirology* 2008; 5: 119.

Lee HY, Perelson AS, Park SC, *et al.* Dynamic correlation between intrahost HIV-1 quasispecies evolution and disease progression. *PLoS Comput Biol.* 2008; 4: e1000240.

Lee GQ, Swenson LC, Poon AF, *et al.* Prolonged and substantial discordance in prevalence of raltegravir-resistant HIV-1 in plasma versus PBMC samples revealed by 454 "deep" sequencing. *PLoS One* 2012; 7: e46181.

Lee GQ, Dong W, Mo T, *et al.* Limited evolution of inferred HIV-1 tropism while viremia is undetectable during standard HAART therapy. *PLoS One* 2014; 9: e99000.

Lee GQ, Lichterfeld M. Diversity of HIV-1 reservoirs in CD4+ T-cell subpopulations. *Curr Opin HIV AIDS* 2016; 11: 383-7

Lee GQ, Orlova-Fink N, Einkauf K, *et al.* Clonal expansion of genome-intact HIV-1 in functionally polarized Th1 CD4+ T cells. *J Clin Invest* 2017; 127: 2689-96.

Lee GQ, Reddy K, Einkauf K, G *et al.* HIV reservoir establishment during hyperacute clade C infection. *Conferenc on Retroviruses and Opportunistic Infections*. March 4–7, 2018, Boston, MA. Abstract 339.

Lee SK, Kim CJ, Kim DJ, *et al.* Immune cells in the female reproductive tract. *Immune Netw* 2015; 15: 16-26.

Lerner P, Guadalupe M, Donovan R, *et al.* The gut mucosal viral reservoir in HIV-infected patients is not the major source of rebound plasma viremia following interruption of highly active antiretroviral therapy. *J Virol* 2011; 85: 4772-82.

Lewden C, Chene G, Morlat P, *et al.* HIV-infected adults with a CD4 cell count greater than 500 cells/mm<sup>3</sup> on long-term combination antiretroviral therapy reach same mortality rates as the general population. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2007; 46: 72-7.

Lewden C, Bouteloup V, De Wit S, *et al.* All-cause mortality in treated HIV-infected adults with CD4  $\geq$ 500/mm<sup>3</sup> compared with the general population: evidence from a large European observational cohort collaboration. *Int J Epidemiol* 2012; 41: 433-45.

Lewin SR, Rouzioux C. HIV cure and eradication: how will we get from the laboratory to effective clinical trials? *AIDS* 2011; 25: 885-97.

Li H, Bar KJ, Wang S, *et al.* High Multiplicity Infection by HIV-1 in Men Who Have Sex with Men. *PLoS Pathog* 2010; 6: e1000890.

Li JZ, Paredes R, Ribaldo HJ, *et al.* Low-frequency HIV-1 drug resistance mutations and risk of NNRTI-based antiretroviral treatment failure: a systematic review and pooled analysis. *JAMA* 2011; 305: 1327-35.

Li JZ, Kuritzkes DR. Clinical implications of HIV-1 minority variants. *Clin Infect Dis* 2013; 56(11):1667-74.

Li G, De Clercq E. HIV Genome-Wide Protein Associations: a Review of 30 Years of Research. *Microbiol Mol Biol Rev* 2016; 80: 679-731.

Liang EC, Sceats L, Bayless NL, *et al.* Association between latent proviral characteristics and immune activation in antiretrovirus-treated human immunodeficiency virus type 1-infected adults. *J Virol* 2014; 88: 8629-39.

Liu Y, Liu H, Kim BO, *et al.* CD4-independent infection of astrocytes by human immunodeficiency virus type 1: requirement for the human mannose receptor. *J Virol* 2004; 78: 4120-33.

Liuzzi G, D'Offizi G, Topino S, *et al.* Dynamics of viral load rebound in plasma and semen after stopping effective antiretroviral therapy. *AIDS Lond Engl* 2003; 17: 1089–92.

Llibre JM, Arribas JR, Domingo P *et al.* Clinical implications of fixed-dose coformulations of antiretrovirals on the outcome of HIV-1 therapy. *AIDS* 2011; 25: 1683-90.

Lorenzo-Redondo R, Fryer HR, Bedford T, *et al.* Persistent HIV-1 replication maintains the tissue reservoir during therapy. *Nature* 2016; 530: 51-6.

Lythgoe KA, Blanquart F, Pellis L, *et al.* Large Variations in HIV-1 Viral Load Explained by Shifting-Mosaic Metapopulation Dynamics. *PLoS Biol* 2016; 14: e1002567.

Maes M, Loyter A, Friedler A. Peptides that inhibit HIV-1 integrase by blocking its protein-protein interactions. *FEBS J* 2012; 279: 2795-809.

Magadán JG, Bonifacino JS. Transmembrane domain determinants of CD4 Downregulation by HIV-1 Vpu. *J Virol* 2012; 86: 757-72.

Maldarelli F, Wu X, Su L, *et al.* HIV latency. Specific HIV integration sites are linked to clonal expansion and persistence of infected cells. *Science* 2014; 345: 179-83.

Malet I, Subra F, Charpentier C, *et al.* Mutations Located outside the Integrase Gene Can Confer Resistance to HIV-1 Integrase Strand Transfer Inhibitors. *MBio* 2017; 8.

Martínez E, D'Albuquerque PM, Llibre JM, *et al.* Changes in cardiovascular biomarkers in HIV-infected patients switching from ritonavir-boosted protease inhibitors to raltegravir. *AIDS* 2012; 26: 2315-26.

Matusali G, Dereuddre-Bosquet N, Le Tortorec A, *et al.* Detection of Simian Immunodeficiency Virus in Semen, Urethra, and Male Reproductive Organs during Efficient Highly Active Antiretroviral Therapy. *J Virol* 2015; 89: 5772-87.

May MT, Vehreschild JJ, Trickey A, *et al.* Mortality According to CD4 Count at Start of Combination Antiretroviral Therapy Among HIV-infected Patients Followed for up to 15 Years After Start of Treatment: Collaborative Cohort Study. *Clin Infect Dis* 2016; 62: 1571-7.

McBride K, Xu Y, Bailey M, *et al.* The majority of HIV type 1 DNA in circulating CD4+ T lymphocytes is present in non-gut-homing resting memory CD4+ T cells. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2013; 29: 1330-9.

Melikyan GB. HIV entry: a game of hide-and-fuse? *Curr Opin Virol* 2014; 4: 1-7.

Monteiro P, Perez I, Laguno M, *et al.* Dual therapy with etravirine plus raltegravir for virologically suppressed HIV-infected patients: a pilot study. *J Antimicrob Chemother* 2014; 69: 742-8.

Metzner KJ, Bonhoeffer S, Fischer M, *et al.* Emergence of minor populations of human immunodeficiency virus type 1 carrying the M184V and L90M mutations in subjects undergoing structured treatment interruptions. *J Infect Dis* 2003; 188: 1433-43.

Metzner KJ, Rauch P, Walter H, *et al.* Detection of minor populations of drug-resistant HIV-1 in acute seroconverters. *AIDS* 2005; 19: 1819-25.

Metzner KJ, Rauch P, von Wyl V, *et al.* Efficient suppression of minority drug-resistant HIV type 1 (HIV-1) variants present at primary HIV-1 infection by ritonavir-boosted protease inhibitor-containing antiretroviral therapy. *J Infect Dis* 2010; 201: 1063-71.

Metzner KJ, Scherrer AU, von Wyl V, *et al.* Limited clinical benefit of minority K103N and Y181C-variant detection in addition to routine genotypic resistance testing in antiretroviral therapy-naive patients. *AIDS* 2014; 28: 2231-9.

Molina JM, Cahn P, Grinsztejn B, *et al.* Rilpivirine versus efavirenz with tenofovir and emtricitabine in treatment-naïve adults infected with HIV-1 (ECHO): a phase 3 randomised double-blind active-controlled trial. *Lancet* 2011; 378: 238-46.

Molina JM, Clotet B, van Lunzen J, *et al.* Once-daily dolutegravir versus darunavir plus ritonavir for treatment-naïve adults with HIV-1 infection (FLAMINGO): 96 week results from a randomised, open-label, phase 3b study. *Lancet HIV* 2015; 2: e127-36

Moorthy A, Kuhn L, Coovadia A, *et al.* Induction therapy with protease-inhibitors modifies the effect of nevirapine resistance on virologic response to nevirapine-based HAART in children. *Clin Infect Dis* 2011; 52: 514-21.

Morand-Joubert L, Ghosn J, Delaugerre C, *et al.* Lack of benefit of 3-month intensification with enfuvirtide plus optimized background regimen (OBR) versus OBR alone in patients with multiple therapeutic failures: the INNOVE study. *J Med Virol* 2012; 84: 1710-8.

Morlat P, Roussillon C, Henard S, *et al.* Causes of death among HIV-infected patients in France in 2010 (national survey): trends since 2000. *AIDS* 2014; 28: 1181-91.

Morlat P, 2017. Rapport sur la prise en charge des personnes vivant avec le VIH. Available at: <https://cns.sante.fr> (Accessed in April 2018)

Morris SR, Zhao M, Smith DM, *et al.* Longitudinal Viral Dynamics in Semen During Early HIV Infection. *Clin Infect Dis* 2017; 64: 428-434.

Mouscadet JF, Tchertanov L. Raltegravir: molecular basis of its mechanism of action. *Eur J Med Res* 2009; 14: 5-16.

Mouscadet JF, Desmaële D. Chemistry and structure-activity relationship of the styrylquinoline-type HIV integrase inhibitors. *Molecules*. 2010; 15: 3048-78.



Mujugira A, Coombs RW, Heffron R, *et al.* Seminal HIV-1 RNA Detection in Heterosexual African Men Initiating Antiretroviral Therapy. *J Infect Dis* 2016; 214: 212-5.

Nachega JB, Mugavero MJ, Zeier M, *et al.* Treatment simplification in HIV-infected adults as a strategy to prevent toxicity, improve adherence, quality of life and decrease healthcare costs. *Patient Prefer Adherence* 2011; 5: 357-67.

Narang BK, Grewal GK, Roy S, *et al.* A novel integrase targeting agent to explore the future prospective of HIV eradication: dolutegravir. *Curr HIV Res* 2014; 12: 325-38

Ndhlovu ZM, Kanya P, Mewalal N, *et al.* Magnitude and Kinetics of CD8+ T Cell Activation during Hyperacute HIV Infection Impact Viral Set Point. *Immunity* 2015; 43: 591-604.

Nicot F, Sauné K, Raymond S, *et al.* Minority resistant HIV-1 variants and the response to first-line NNRTI therapy. *J Clin Virol* 2015; 62: 20-4.

Novitsky V, Lagakos S, Herzig M, *et al.* Evolution of proviral gp120 over the first year of HIV-1 subtype C infection. *Virology* 2009; 383: 47-59.

Nunnari G, Sullivan J, Xu Y, *et al.* HIV type 1 cervicovaginal reservoirs in the era of HAART. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2005; 21: 714-8.

Orrell C, Hagins DP, Belonosova E, *et al.* Fixed-dose combination dolutegravir, abacavir, and lamivudine versus ritonavir-boosted atazanavir plus tenofovir disoproxil fumarate and emtricitabine in previously untreated women with HIV-1 infection (ARIA): week 48 results from a randomised, open-label, non-inferiority, phase 3b study. *Lancet HIV* 2017; 4: e536-e546.

Osterholzer DA, Goldman M. Dolutegravir: A Next-Generation Integrase Inhibitor for Treatment of HIV Infection. *Clin Infect Dis* 2014; 59: 265-71.

Paiardini M, Müller-Trutwin M. HIV-associated chronic immune activation. *Immunol Rev* 2013; 254: 78-101.

Palella FJ Jr, Fisher M, Tebas P, *et al.* Simplification to rilpivirine/emtricitabine/tenofovir disoproxil fumarate from ritonavir-boosted protease inhibitor antiretroviral therapy in a randomized trial of HIV-1 RNA-suppressed participants. *AIDS* 2014; 28: 335-44.

Palmer S, Maldarelli F, Wiegand A, *et al.* Low-level viremia persists for at least 7 years in patients on suppressive antiretroviral therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105: 3879-84.

Palmer S, Josefsson L, Coffin JM. HIV reservoirs and the possibility of a cure for HIV infection. *J Intern Med* 2011; 270: 550-60

Paquet AC, Baxter J, Weidler J, *et al.* Differences in reversion of resistance mutations to wild-type under structured treatment interruption and related increase in replication capacity. *PLoS One* 2011; 6: e14638.

Paredes R, Marconi VC, Campbell TB, *et al.* Systematic evaluation of allele-specific real-time PCR for the detection of minor HIV-1 variants with pol and env resistance mutations. *J Virol Methods* 2007; 146: 136-46.

Paredes R, Lalama CM, Ribaldo HJ, *et al.* Pre-existing minority drug-resistant HIV-1 variants, adherence, and risk of antiretroviral treatment failure. *J Infect Dis* 2010; 201: 662-71.

Parrish NF, Gao F, Li H, *et al.* Phenotypic properties of transmitted founder HIV-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013; 110: 6626-33.

Paterson DL, Swindells S, Mohr J, *et al.* Adherence to protease inhibitor therapy and outcomes in patients with HIV infection. *Ann Intern Med* 2000; 133: 21-30.

Peeters M, D'Arc M, Delaporte E. Origin and diversity of human retroviruses. *AIDS Rev* 2014; 16: 23-34.

Pellegrin I, Caumont A, Garrigue I, *et al.* Predictive value of provirus load and DNA human immunodeficiency virus genotype for successful abacavir-based simplified therapy. *J Infect Dis* 2003; 187: 38-46.

Perelson AS, Neumann AU, Markowitz M, *et al.* HIV-1 dynamics in vivo: virion clearance rate, infected cell life-span, and viral generation time. *Science* 1996; 271: 1582-6.

Permanyer M, Ballana E, Esté JA. Endocytosis of HIV: anything goes. *Trends Microbiol* 2010; 18: 543-51.

Perrier M, Visseaux B, Landman R, *et al.* No impact of HIV-1 protease minority resistant variants on the virological response to a first-line PI-based regimen containing darunavir or atazanavir. *J Antimicrob Chemother* 2018; 73: 173-176.

Pham HT, Mesplède T. The latest evidence for possible HIV-1 curative strategies. *Drugs Context* 2018; 7: 212522.

Pingen M, Nijhuis M, de Bruijn JA, *et al.* Evolutionary pathways of transmitted drug-resistant HIV-1. *J Antimicrob Chemother* 2011; 66: 1467-80.

Podany AT, Scarsi KK, Fletcher CV. Comparative Clinical Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of HIV-1 Integrase Strand Transfer Inhibitors. *Clin Pharmacokinet* 2017; 56: 25-40.

Poles MA, Elliott J, Vingerhoets J, *et al.* Despite high concordance, distinct mutational and phenotypic drug resistance profiles in human immunodeficiency virus type 1 RNA are observed in gastrointestinal mucosal biopsy specimens and peripheral blood mononuclear cells compared with plasma. *J Infect Dis* 2001; 183: 143–148.

Pope M, Haase AT. Transmission, acute HIV-1 infection and the quest for strategies to prevent infection. *Nat Med* 2003; 9: 847-52.

Poss M, Rodrigo AG, Gosink JJ, *et al.* Evolution of envelope sequences from the genital tract and peripheral blood of women infected with clade A human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* 1998; 72: 8240-51.

Preston BD, Poiesz BJ, Loeb LA. Fidelity of HIV-1 reverse transcriptase. *Science* 1988; 242: 1168-71.

Protopopescu C, Carrieri MP, Raffi F, *et al.* Brief Report: Prolonged Viral Suppression Over a 12-Year Follow-up of HIV-Infected Patients: The Persistent Impact of Adherence at 4 Months After Initiation of Combined Antiretroviral Therapy in the ANRS CO8 APROCO-COPILOTE Cohort. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2017; 74: 293-297.

Raffi F, Rachlis A, Stellbrink HJ, *et al.* Once-daily dolutegravir versus raltegravir in antiretroviral-naïve adults with HIV-1 infection: 48 week results from the randomised, double-blind, non-inferiority SPRING-2 study. *Lancet* 2013; 381: 735-43.

Raffi F, Jaeger H, Quiros-Roldan E, *et al.* Once-daily dolutegravir versus twice-daily raltegravir in antiretroviral-naïve adults with HIV-1 infection (SPRING-2 study): 96 week results from a randomised, double-blind, non-inferiority trial. *Lancet Infect Dis* 2013; 13: 927-35.

Rajasuriar R, Wright E, Lewin SR. Impact of antiretroviral therapy (ART) timing on chronic immune activation/inflammation and end-organ damage. *Curr Opin HIV AIDS* 2015; 10: 35-42.

Rao G, Sutton S, Hardin J, *et al.* Impact of Highly Active Antiretroviral Therapy Regimen on Adherence and Risk of Hospitalization in Veterans with HIV/AIDS Presented at : 53rd Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy; 2013; Denver. [Presentation H-1464].

Rausch JW, Le Grice SF. HIV Rev Assembly on the Rev Response Element (RRE): A Structural Perspective. *Viruses* 2015; 7: 3053-75.

Raymond S, Saliou A, Nicot F, *et al.* Characterization of CXCR4-using HIV-1 during primary infection by ultra-deep pyrosequencing. *J Antimicrob Chemother* 2013; 68: 2875-81.

Raymond S, Saliou A, Delobel P, *et al.* Evolution of HIV-1 quasispecies and coreceptor use in cell reservoirs of patients on suppressive antiretroviral therapy. *J Antimicrob Chemother* 2014; 69: 2527-30.

Raymond S, Nicot F, Pallier C, *et al.* Impact of HIV-1 minority variants on the virus response to a rilpivirine-based first line regimen. *Clin Infect Dis* 2017 (in press).

Reinsch N, Neuhaus K, Esser S, *et al.* Are HIV patients undertreated? Cardiovascular risk factors in HIV: results of the HIV-HEART study. *Eur J Prev Cardiol* 2012; 19: 267-74.

Rey, 2017 Rapport d'activité, Le Trait d'Union 2016. Available at: <https://www.docvadis.fr/medicale-a/> (Accessed in April 2018)

Rice AP, Kimata JT. Subversion of Cell Cycle Regulatory Mechanisms by HIV. *Cell Host Microbe* 2015; 17: 736-40.

Riddler SA, Smit E, Cole SR, *et al.* Impact of HIV infection and HAART on serum lipids in men. *JAMA* 2003; 289: 2978-82.

Ritola K, Pilcher CD, Fiscus SA, *et al.* Multiple V1/V2 env variants are frequently present during primary infection with human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* 2004; 78: 11208-18.

Robb ML, Ananworanich J. Lessons from acute HIV infection. *Curr Opin HIV AIDS* 2016; 11: 555-560.

Rodger AJ, Lodwick R, Schechter M, *et al.* Mortality in well controlled HIV in the continuous antiretroviral therapy arms of the SMART and ESPRIT trials compared with the general population. *AIDS* 2013; 27: 973-9

Roussillon C, Henard S, Hardel L *et al.* Causes de deces des patients infectes par le VIH en France en 2010. Etude ANRS EN20 Mortalité 2010. Bull Epidemiol Hebd 2012; 46-47: 541-45.

Rozera G, Abbate I, Vlassi C, *et al.* Quasispecies tropism and compartmentalization in gut and peripheral blood during early and chronic phases of HIV-1 infection: possible correlation with immune activation markers. Clin Microbiol Infect 2014; 20: O157-66.

Rueda CM, Velilla PA, Chougnet CA, *et al.* HIV-induced T-cell activation/exhaustion in rectal mucosa is controlled only partially by antiretroviral treatment. PLoS One 2012; 7: e30307.

Sadiq ST, Taylor S, Kaye S, *et al.* The effects of antiretroviral therapy on HIV-1 RNA loads in seminal plasma in HIV-positive patients with and without urethritis. AIDS 2002; 16: 219-25.

Sáez-Ciri3n A, Bacchus C, Hocqueloux L, *et al.* Post-treatment HIV-1 controllers with a long-term virological remission after the interruption of early initiated antiretroviral therapy ANRS VISCONTI Study. PLoS Pathog 2013; 9: e1003211.

Sakai K, Dimas J, Lenardo MJ. The Vif and Vpr accessory proteins independently cause HIV-1-induced T cell cytopathicity and cell cycle arrest. Proc Natl Acad Sci U S A 2006; 103: 3369-74.

Sandler NG, Wand H, Roque A, *et al.* Plasma levels of soluble CD14 independently predict mortality in HIV infection. J Infect Dis. 2011; 203: 780-90.

Santos da Silva E, Mulinge M, Perez Bercoff D. The frantic play of the concealed HIV envelope cytoplasmic tail. Retrovirology 2013; 10: 54.

Schuurman R, Demeter L, Reichelderfer P, *et al.* Worldwide evaluation of DNA sequencing approaches for identification of drug resistance mutations in the human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase. J Clin Microbiol 1999; 37: 2291-6.

Sede MM, Moretti FA, Laufer NL, *et al.* HIV-1 tropism dynamics and phylogenetic analysis from longitudinal ultra-deep sequencing data of CCR5- and CXCR4-using variants. *PLoS One* 2014; 9: e102857.

Sereti I, Krebs SJ, Phanuphak N, *et al.* Persistent, Albeit Reduced, Chronic Inflammation in Persons Starting Antiretroviral Therapy in Acute HIV Infection. *Clin Infect Dis* 2017; 64: 124-131.

Shankarappa R, Margolick JB, Gange SJ, *et al.* Consistent viral evolutionary changes associated with the progression of human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Virol* 1999; 73: 10489-502.

Sheth PM, Kovacs C, Kemal KS, *et al.* Persistent HIV RNA shedding in semen despite effective antiretroviral therapy. *AIDS* 2009; 23: 2050-4.

Shriner D, Liu Y, Nickle DC, *et al.* Evolution of intrahost HIV-1 genetic diversity during chronic infection. *Evolution*. 2006; 60: 1165-76.

Shukair SA, Allen SA, Cianci GC, *et al.* Human cervicovaginal mucus contains an activity that hinders HIV-1 movement. *Mucosal Immunol* 2013; 6: 427-34.

Siliciano JD, Siliciano RF. Recent developments in the effort to cure HIV infection: going beyond N = 1. *J Clin Invest* 2016; 126: 409-14.

Silva EF, Charreau I, Gourmel B, *et al.* Decreases in inflammatory and coagulation biomarkers levels in HIV-infected patients switching from enfuvirtide to raltegravir: ANRS 138 substudy. *J Infect Dis* 2013; 208: 892-7.

Simen BB, Simons JF, Hullsiek KH, *et al.* Low-abundance drug-resistant viral variants in chronically HIV-infected, antiretroviral treatment-naive patients significantly impact treatment outcomes. *J Infect Dis* 2009; 199: 693-701

Simen BB, Braverman MS, Abbate I, *et al.* An international multicenter study on HIV-1 drug resistance testing by 454 ultra-deep pyrosequencing. *J Virol Methods* 2014; 204:31-7.

Simonetti FR, Kearney MF. Review: Influence of ART on HIV genetics. *Curr Opin HIV AIDS* 2015; 10: 49-54.

Smith C, Sabin CA, Lundgren JD, *et al.* Factors associated with specific causes of death amongst HIV-positive individuals in the D:A:DStudy. *AIDS* 2010; 24: 1537-48.

Smith MZ, Wightman F, Lewin SR. HIV reservoirs and strategies for eradication. *Curr HIV/AIDS Rep.* 2012; 9: 5-15.

Sloan RD, Wainberg MA. The role of unintegrated DNA in HIV infection. *Retrovirology* 2011; 8: 52.

Stax MJ, Mouser EE, van Montfort T, *et al.* Colorectal mucus binds DC-SIGN and inhibits HIV-1 trans-infection of CD4+ T-lymphocytes. *PLoS One* 2015; 10: e0122020.

Stekler J, Collier AC. Primary HIV Infection. *Curr HIV/AIDS Rep* 2004; 1: 68-73.

Strain MC, Günthard HF, Havlir DV, *et al.* Heterogeneous clearance rates of long-lived lymphocytes infected with HIV: intrinsic stability predicts lifelong persistence. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100: 4819-24.

Sturdevant CB, Dow A, Jabara CB, *et al.* Central nervous system compartmentalization of HIV-1 subtype C variants early and late in infection in young children. *PLoS Pathog* 2012; 8: e1003094.

Sullivan ST, Mandava U, Evans-Strickfaden T, *et al.* Diversity, divergence, and evolution of cell-free human immunodeficiency virus type 1 in vaginal secretions and blood of chronically infected women: associations with immune status. *J Virol* 2005; 79: 9799-809.



Sundquist WI, Kräusslich HG. HIV-1 assembly, budding, and maturation. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2012; 2: a006924.

Supervie V, Marty L, Lacombe JM, *et al.* Looking Beyond the Cascade of HIV Care to End the AIDS Epidemic: Estimation of the Time Interval From HIV Infection to Viral Suppression. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2016; 73: 348-355.

Suzuki H, Motohara M, Miyake A, *et al.* Intrathymic effect of acute pathogenic SHIV infection on T-lineage cells in newborn macaques. *Microbiol Immunol* 2005; 49: 667-79.

Swenson LC, Mo T, Dong WW, *et al.* Deep sequencing to infer HIV-1 co-receptor usage: application to three clinical trials of maraviroc in treatment-experienced patients. *J Infect Dis* 2011; 203: 237-45.

Tachet A, Dulioust E, Salmon D, *et al.* Detection and quantification of HIV-1 in semen: identification of a subpopulation of men at high potential risk of viral sexual transmission. *AIDS* 1999; 13: 823-31.

Thierry E, Deprez E, Delelis O. Different Pathways Leading to Integrase Inhibitors Resistance. *Front Microbiol* 2017; 7: 2165.

Thompson CG, Gay CL, Kashuba ADM. HIV Persistence in Gut-Associated Lymphoid Tissues: Pharmacological Challenges and Opportunities. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2017; 33: 513-523.

Tincati C, Biasin M, Bandera A, *et al.* Early initiation of highly active antiretroviral therapy fails to reverse immunovirological abnormalities in gut-associated lymphoid tissue induced by acute HIV infection. *Antivir Ther* 2009; 14: 321-30.

Trezza CR, Kashuba AD. Pharmacokinetics of antiretrovirals in genital secretions and anatomic sites of HIV transmission: implications for HIV prevention. *Clin Pharmacokinet* 2014; 53: 611-24.

Trottier B, Lake JE, Logue K, *et al.* Dolutegravir/abacavir/lamivudine versus current ART in virally suppressed patients (STRIVING): a 48-week, randomized, non-inferiority, open-label, Phase IIIb study. *Antivir Ther* 2017; 22: 295-305.

Tully DC, Ogilvie CB, Batorsky RE, *et al.* Differences in the Selection Bottleneck between Modes of Sexual Transmission Influence the Genetic Composition of the HIV-1 Founder Virus. *PLoS Pathog* 2016; 12: e1005619.

Turriziani O, Andreoni M, Antonelli G. Resistant viral variants in cellular reservoirs of human immunodeficiency virus infection. *Clin Microbiol Infect* 2010; 16: 1518-24.

Valantin MA, Lambert-Niclot S, Flandre P, *et al.* Long-term efficacy of darunavir/ritonavir monotherapy in patients with HIV-1 viral suppression: week 96 results from the MONOI ANRS 136 study. *J Antimicrob Chemother* 2012; 67: 691-5.

Valentin A, Pavlakis GN. Natural killer cells are persistently infected and resistant to direct killing by HIV-1. *Anticancer Res* 2003; 23: 2071-5.

Vallejo A, Gutierrez C, Hernandez-Novoa B, *et al.* The effect of intensification with raltegravir on the HIV-1 reservoir of latently infected memory CD4 T cells in suppressed patients. *AIDS* 2012; 26: 1885-94.

Van Damme N, Guatelli J. HIV-1 Vpu inhibits accumulation of the envelope glycoprotein within clathrin-coated, Gag-containing endosomes. *Cell Microbiol* 2008; 10: 1040-57.

Van Zyl GU, Katusiime MG, Wiegand A, *et al.* No evidence of HIV replication in children on antiretroviral therapy. *J Clin Invest* 2017; 127: 3827-3834.

van Marle G, Church DL, Nunweiler KD, *et al.* Higher levels of Zidovudine resistant HIV in the colon compared to blood and other gastrointestinal compartments in HIV infection. *Retrovirology* 2010; 7: 74.

Varghese B, Maher JE, Peterman TA, *et al.* Reducing the risk of sexual HIV transmission: quantifying the per-act risk for HIV on the basis of choice of partner, sex act, and condom use. *Sex Transm Dis* 2002; 29: 38-43.

Verhofstede C, Noë A, Demecheleer E, *et al.* Drug-resistant variants that evolve during nonsuppressive therapy persist in HIV-1-infected peripheral blood mononuclear cells after long-term highly active antiretroviral therapy. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2004; 35: 473-83.

Vernazza PL, Eron JJ, Fiscus SA, *et al.* Sexual transmission of HIV: infectiousness and prevention. *AIDS* 1999; 13: 155-66.

Visseaux B, Damond F, Matheron S, *et al.* Hiv-2 molecular epidemiology. *Infect Genet Evol* 2016; 46: 233-240

von Stockenstrom S, Odevall L, Lee E, *et al.* Longitudinal Genetic Characterization Reveals That Cell Proliferation Maintains a Persistent HIV Type 1 DNA Pool During Effective HIV Therapy. *J Infect Dis* 2015; 212: 596-607.

Wagner TA, Kress CM, Beck I, *et al.* Detection of HIV-1 drug resistance in women following administration of a single dose of nevirapine: comparison of plasma RNA to cellular DNA by consensus sequencing and by oligonucleotide ligation assay. *J Clin Microbiol* 2010; 48: 1555-61.

Wainberg MA, Han YS. Will drug resistance against dolutegravir in initial therapy ever occur? *Front Pharmacol* 2015; 6: 90.

Walker BD, Hirsch MS. Antiretroviral therapy in early HIV infection. *N Engl J Med* 2013, 368: 279-281.

Walker BD, Yu XG. Unravelling the mechanisms of durable control of HIV-1. *Nat Rev Immunol* 2013; 13: 487-98.

Walmsley SL, Antela A, Clumeck N, *et al.* Dolutegravir plus abacavir-lamivudine for the treatment of HIV-1 infection. *N Engl J Med* 2013; 369: 1807-18.

Walmsley S, Baumgarten A, Berenguer J, *et al.* Brief Report: Dolutegravir Plus Abacavir/Lamivudine for the Treatment of HIV-1 Infection in Antiretroviral Therapy-Naive Patients: Week 96 and Week 144 Results From the SINGLE Randomized Clinical Trial. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2015; 70: 515-9.

Wilén CB, Tilton JC, Doms RW. HIV: cell binding and entry. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2012; 2.

Williams JP, Hurst J, Stöhr W, *et al.* HIV-1 DNA predicts disease progression and post-treatment virological control. *Elife* 2014: e03821.

Wirde M, Soulie C, Valantin MA, *et al.* Historical HIV-RNA resistance test results are more informative than proviral DNA genotyping in cases of suppressed or residual viraemia. *J Antimicrob Chemother* 2011; 66: 709-12.

Wu L, KewalRamani VN. Dendritic-cell interactions with HIV: infection and viral dissemination. *Nat Rev Immunol* 2006; 6: 859-68.

Wyatt R, Sodroski J. The HIV-1 envelope glycoproteins: fusogens, antigens, and immunogens. *Science* 1998; 280: 1884-8.

Yukl S, Gianella S, Sinclair E, *et al.*: Differences in HIV burden and immune activation within the gut of HIV+ patients on suppressive antiretroviral therapy. *J Infect Dis* 2010; 202: 1553–61.

Yukl SA, Shergill AK, Ho T, *et al.* The distribution of HIV DNA and RNA in cell subsets differs in gut and blood of HIV-positive patients on ART: implications for viral persistence. *J Infect Dis* 2013; 208: 1212-20.

# Annexes

---

## Drug resistance and tropism as markers of the dynamics of HIV-1 DNA quasispecies in blood cells of heavily pretreated patients who achieved sustained virological suppression

Pierre Gantner<sup>1,2</sup>, Laurence Morand-Joubert<sup>3</sup>, Charlotte Sueur<sup>2</sup>, François Raffi<sup>4</sup>, Catherine Fagard<sup>5</sup>, Caroline Lascoux-Combe<sup>6</sup>, Dominique Salmon<sup>7</sup>, Corinne Amiel<sup>8</sup>, Sidonie Lambert-Niclot<sup>9</sup>, Djeneba Bocar Fofana<sup>3</sup>, Jean-Paul Viard<sup>1,10</sup>, Samira Fafi-Kremer<sup>2</sup>, Christine Rouzioux<sup>1,11</sup>, Véronique Avettand-Fenoel<sup>1,11†</sup> and Jade Ghosn<sup>1,10\*†</sup>

<sup>1</sup>Université Paris Descartes, EA 7327, Université Paris Descartes PRES Sorbonne Paris-Cité, Paris, France; <sup>2</sup>Laboratoire de Virologie, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Strasbourg, France; <sup>3</sup>Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, INSERM, Institut Pierre Louis d'Epidémiologie et de Santé Publique (IPLESP UMRS 1136), F75013 Paris, France/Department of Virology, Hôpital Saint-Antoine, APHP, Paris, France; <sup>4</sup>CMIT, 46 Rue Henri Huchard, 75018 Paris, France; <sup>5</sup>Univ. Bordeaux, ISPED, Centre INSERM U897- Epidémiologie-Biostatistique, F-33000 Bordeaux, France/INSERM, ISPED, Centre INSERM U897-Epidémiologie-Biostatistique, F-33000 Bordeaux, France; <sup>6</sup>APHP, Service des Maladies Infectieuses et Tropicales, Hôpital Saint Louis, Paris, France; <sup>7</sup>APHP, Service de Médecine Interne, Hôpital Cochin, Paris, France/Université Paris Descartes, Paris, France; <sup>8</sup>UPMC Univ Paris 06, Centre d'Immunologie et de Maladies Infectieuses (CIMI) UMRS CR7, Persistent Viral Infection (PVI) Team, INSERM U1135, Paris, France/APHP, Virology Laboratory, Tenon Hospital, Paris, France; <sup>9</sup>Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, UMR S 1136, Institut Pierre Louis d'Epidémiologie et de Santé Publique, INSERM, UMR S 1136, Institut Pierre Louis d'Epidémiologie et de Santé Publique, Service de Virologie, Hôpital Pitié-Salpêtrière, AP-HP, Paris, France; <sup>10</sup>APHP, Unité Fonctionnelle de Thérapeutique en Immuno-Infectiologie, Centre Hospitalier Universitaire Hôtel-Dieu, Paris, France; <sup>11</sup>APHP, Laboratoire de Microbiologie Clinique, Centre Hospitalier Universitaire Necker Enfants Malades, Paris, France

\*Corresponding author. Equipe d'Accueil EA 7327, Université Paris Descartes, Faculté de Médecine site Necker, Laboratoire de Virologie, 149 Rue de Vaugirard, 75015 Paris, France. Tel: +33-1-42-34-88-36; Fax: +33-1-42-34-88-52; E-mail: jade.ghosn@aphp.fr

†Both authors contributed equally to this work.

Received 17 September 2015; returned 16 October 2015; revised 19 October 2015; accepted 21 October 2015

**Objectives:** The objective of this study was to address the dynamics of archived resistant quasispecies in cell-associated HIV-1 DNA over time in heavily ART-experienced patients with currently suppressed plasma HIV-1 RNA.

**Methods:** Longitudinal ultra-deep sequencing (UDS) analysis of reverse transcriptase, protease and V3 Env regions was performed on blood-cell-associated HIV-1 DNA samples. Drug-resistance-associated mutations (DRAMs) and tropism were interpreted using the ANRS and Geno2Pheno algorithms. We analysed frozen blood cells from patients enrolled in the INNOVE and ANRS 123 ETOILE studies who achieved sustained viral suppression after salvage optimized ART (SOT).

**Results:** Samples were available at baseline and 6 and  $\geq 12$  months after SOT initiation in 10 patients. V3 loop sequences displayed wide intra-individual dynamics over time. Viral variants harbouring DRAMs exhibited three non-exclusive scenarios. First, when SOT exerted the same selective pressure as previous failing regimens, some viral quasispecies still harboured the same DRAMs at the same level as at the time of virological failure. Thus, as DRAMs were mostly associated with the same viral variant, variants with a complete resistance pattern remained archived. Second, some viral variants harbouring DRAMs were no longer detected over time when SOT consisted of new antiretroviral classes or had resistance profiles distinct from those of previous failing regimens. Third, variants with new DRAMs associated with SOT emerged in blood cells during follow-up despite sustained virological control.

**Conclusions:** Using longitudinal UDS analysis and focusing on DRAMs and tropism as markers, we demonstrated that, despite sustained virological control, archived HIV-1 DNA quasispecies continued to evolve.

### Introduction

HIV-1 ART is a life-long treatment. While virological success is achieved in most patients, ART often needs to be modified due

to adverse events, drug–drug interactions, simplification to improve adherence, or treatment failure. Treatment modification is complicated in heavily ART-experienced patients harbouring viruses with past drug-resistance-associated mutations (DRAMs)

who are currently controlled under effective treatment. In these patients, in whom plasma HIV-1 RNA is suppressed and therefore cannot be amplified, genotypic resistance testing may be performed on blood-cell-associated HIV-1 DNA. Population HIV-1 DNA genotyping does not recapitulate exhaustively all the accumulated DRAMs previously reported from genotypes detected in plasma samples.<sup>1,2</sup> Therefore, ART history and cumulative past plasma HIV-1 RNA genotypes are more informative than HIV-1 DNA genotypes to guide treatment modifications.

It has been described that all circulating HIV-1 variants are archived in blood cells and other reservoirs, such as gut or semen, for an unknown duration.<sup>3–6</sup> Thus, archived resistant variants can persist for a lengthy period of time, as they are archived notably in central memory CD4 T cells<sup>7,8</sup> with a high proliferative potential and a long half-life.<sup>9</sup>

While the Sanger sequencing sensitivity to detect resistant variants within quasispecies of WT viruses is around 20%, ultra-deep sequencing (UDS) assay sensitivity allows for a sensitivity threshold as low as 1%.<sup>10–13</sup> Approaches based on UDS have been used to evaluate the impact of minority drug-resistant variants of plasma HIV-1 RNA on the outcome of a first-line ART combination. Baseline minority resistant variants have been associated with increased rates of virological failure with NNRTI-based regimens, but not with regimens containing ritonavir-boosted PIs or integrase inhibitors.<sup>14,15</sup> A clinically relevant cut-off of 1% minority NNRTI-resistant variants has been suggested to have significant impact on the NNRTI-based first-line regimen outcome.<sup>16</sup> To date, all studies using UDS to evaluate DRAMs were cross-sectional and performed on HIV-1 RNA from plasma samples of naive patients or plasma samples collected at the time of virological failure.<sup>14–16</sup>

To better understand the evolution of archived resistant viral reservoirs over time in heavily ART-experienced patients with currently suppressed plasma HIV-1 RNA, we undertook a longitudinal UDS analysis on blood-cell-associated HIV-1 DNA samples. We selected and included patients with previous virological failures, who were all exposed to three classes of drugs—NRTIs, NNRTIs and PIs—and who subsequently achieved sustained virological control on a salvage optimized ART (SOT) regimen.

The main objective was to address the dynamics and persistence of resistant viruses harbouring DRAMs archived in cell-associated HIV-1 DNA, using UDS, after lengthy periods of suppression of HIV replication in blood plasma.

## Methods

### Study population

Patients were selected from two randomized clinical trials with an enfuvirtide-based optimized regimen arm: (i) the INNOVE study,<sup>17</sup> which enrolled ART-experienced patients with virological failure who were harbouring in plasma multiresistant viruses that were still genotypically susceptible to at least two active compounds; and (ii) the ANRS 123 ETOILE study,<sup>18</sup> which enrolled ART-experienced patients with virological failure and a genotypic score showing two or fewer active drugs, and who received an SOT including or not including enfuvirtide. Nantes Hospital Ethics Committee approved the INNOVE study and institutional ethics review boards approved the ANRS 123 ETOILE study, and all patients gave written informed consent.

Our current analysis of HIV-1 DNA genotyping is a substudy focusing on patients for whom frozen blood cells were available at different timepoints

and who achieved virological suppression as of month 3 after the initiation of an SOT. A total of 29 whole-blood samples were available for 10 patients. There were six patients from the INNOVE study with PBMCs available at baseline, at month 6 and at a third, distant timepoint (4–6 years) and four patients from the ETOILE study with whole-blood samples frozen at baseline and months 6 and 12.

### Total HIV-1 DNA quantification

Total cell-associated DNA was extracted from 200  $\mu$ L of whole blood or pelleted PBMCs with NucleoSpin Blood kit (Macherey-Nagel, Hoerdt, France) or QIAmp DNA Mini kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) respectively, with a final elution volume of 100  $\mu$ L. Total HIV-1 DNA was quantified by a real-time PCR assay with the Generic HIV DNA Cell assay (Biocentric, Bandol, France) as described previously.<sup>19</sup>

### Amplicon generation

UDS was performed on the longitudinal DNA extracts for reverse transcriptase (RT), protease (PR) and V3 loop regions.<sup>20,21</sup>

For the V3 Env region amplification, a first-round PCR was performed using the following primers (in 5'–3' orientation): 1V3f, GGCTTAGGCATC TCCTATGGCAGGAAGAAG (5954–5983; this and all following positions were based on HIV-1 HXB2, GenBank accession number K03455) and 1V3r, GGTCTTAAAGGTACCTGAGGTCTGACTGGA (9000–9029).<sup>21</sup> The first-round PCR was performed as follows: 2 min at 98°C; 10 cycles of 30 s at 98°C, 30 s at 57°C, 4 min at 68°C; 40 cycles of 30 s at 98°C, 30 s at 63°C, 4 min + 5 s/cycle at 68°C; 10 min at 68°C followed by cooling to 4°C. Then, a fragment encompassing the V3 region was generated by nested PCR with the following primers (in 5'–3' orientation): Env7, AATGGCAGT CTAGCAGAAG (7008–7026) and ED33, TTACAGTAGAAAAATCCCCCTC (7360–7381). The nested PCR was performed under the following conditions: 2 min at 98°C; 40 cycles of 30 s at 98°C, 30 s at 55°C, 90 s at 72°C; 10 min at 72°C followed by cooling to 4°C. First-round and nested PCRs were performed according to the manufacturer recommendations with Phusion High Fidelity PCR Master Mix with HF Buffer (Thermo Scientific, Vilnius, Lithuania).

For the PR/RT pol region amplification, a first-round PCR was performed using the following primers (in 5'–3' orientation): 5'prB, GAAGCAGGAGCC GATAGACA (1794–1812) and MJ4, CTGTTAGTGCTTTGGTCTCT (3399–3420). The first-round PCR was performed as follows: 2 min at 98°C; 10 cycles of 30 s at 98°C, 30 s at 57°C, 2 min at 68°C; 40 cycles of 30 s at 98°C, 30 s at 63°C, 2 min + 5 s/cycle at 68°C; 10 min at 68°C followed by cooling to 4°C. First-round PCR was performed according to the manufacturer recommendations with Phusion High Fidelity PCR Master Mix with HF Buffer (Thermo Scientific, Vilnius, Lithuania). The nested PCR was adapted from the 454/Roche HIV-1 Genotyping Kit v2.<sup>14,20</sup> Our first-round PCR products were subsequently amplified using the microtitre plate of this kit with dried-down primer pairs, to generate four amplicons encompassing PR/RT genes: A (PR), B, C and D (RT).

Each V3 or PR/RT nested PCR primers consisted of a 454 sequencing adaptor (for either forward or reverse sequencing), sample-specific multiplex identifier sequence, and a specific viral sequence for PCR priming.

### HIV drug resistance testing by UDS

Each amplicon was purified with Agencourt AMPure XP magnetic beads (Beckman Coulter, Krefeld, Germany). Amplicons were analysed using an Agilent DNA 1000 Bioanalyser (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) to verify their quality and purity. The purified amplicons were quantified with a fluorescence assay Quant-it Picogreen (Invitrogen, Eugene, OR, USA) following the manufacturer's instructions. Purified amplicons were pooled in equimolar amounts. Clonal amplification on beads (emulsion PCR), bead isolation (breaking) and sequencing was performed according to the manufacturer's protocol, on a GS Junior (Roche/454, Meylan, France).

### DRAM and variant analysis

The sequence reads were analysed with GS amplicon variant analyser (AVA) software (Roche), which assigns each read to the proper amplicon and patient sample using the multiplex identifier. This software also aligns the generated sequence reads with the HIV WT HXB2 sequence and identifies quantitatively drug resistance mutations according to a pre-defined DRAMs list. UDS results were interpreted using the ANRS resistance algorithm V24 ([www.hivfrenchresistance.org](http://www.hivfrenchresistance.org)). The major NRTI, NNRTI and PI resistance mutations were identified using the update 2015 Stanford drug resistance mutation list (<http://hivdb.stanford.edu>). DRAMs were used as markers to characterize HIV-1 DNA blood reservoir dynamics. Genetic signatures of the four amplicons encompassing PR/RT genes were used to reconstruct the whole variants. Resistant HIV DNA load was calculated at each timepoint based on the percentage of quasispecies harbouring DRAMs by UDS and the total cell-associated HIV-1 DNA load.

The tropism of each variant was inferred from the V3 amino acid sequence by geno2pheno available at <http://454.geno2pheno.org/index.php>.<sup>21</sup> V3 loop quasispecies diversity was defined by Shannon entropy.<sup>22</sup> This measure was calculated as  $-\sum p_i \times \log_2(p_i) / \log_2(N)$ , where  $p_i$  is the relative frequency of each variant  $i$  ( $i = 1; \dots; n$  where  $n$  is number of variants by sample) and  $N$  is the total number of sequences analysed by sample. Entropy results can vary from 0 (single variant) to 1 (each sequence represents a single variant).

Intra-patient and inter-sample quasispecies comparisons were assessed using the Wilcoxon signed-rank test and Mann-Whitney test, respectively (<http://marne.u707.jussieu.fr/biostatgw/>).

### Definition of minority resistant variants

The detection limit of drug resistance mutations was fixed at 1%. This conservative cut-off was chosen based on previous reports indicating combined PCR and sequencing error rates of 0.1%–0.3% using 454 amplicon sequencing of HIV-derived clonal sequences.<sup>21,23,24</sup> Variants present in more than 20% of the quasispecies were considered to be major resistant variants, and variants present at a proportion between 1% and 20% were considered to be minor variants.

## Results

### Patients and UDS

Patients' characteristics at the time of initiation of SOT (baseline) are described in Table 1. At the time of enrolment, patients were in virological failure with a median HIV-1 RNA load of 4.7 log<sub>10</sub> copies/mL (range, 3.2–5.2 log<sub>10</sub> copies/mL). Virological success was achieved as soon as month 3 with SOT and sustained during follow-up for all patients. The complete characteristics of study patients are described elsewhere.<sup>17,18,25</sup> Cell-associated HIV-1 DNA load decreased significantly between baseline and month 6 on successful SOT (median, 3.31 log<sub>10</sub> copies/10<sup>6</sup> PBMCs at baseline versus 2.95 log<sub>10</sub> copies/10<sup>6</sup> PBMCs at month 6;  $P = 0.004$ ). Globally, cell-associated HIV-1 DNA remained high, with a median value of 3.0 log<sub>10</sub> copies/10<sup>6</sup> PBMCs (range, 1.9–4.2 log<sub>10</sub> copies/10<sup>6</sup> PBMCs).

Among the 29 samples, UDS results were available for 29 (100%), 28 (97%), 26 (90%), 26 (90%) and 27 (93%) of the amplicons V3, A, B, C and D, respectively. UDS yielded a median of 3553 reads per V3 amplicon (range, 2403–10196 reads) and a median of 2277 reads per PR/RT amplicon (range, 825–6391 reads).

### Longitudinal viral genotropism in blood cells and V3 variants by UDS

Overall, we found 125 variants, including 67% of minority variants (Table 1). At baseline, UDS indicated the presence of R5

quasispecies (R5 variants represented >95% of the quasispecies) in six patients (patients 1, 3, 4, 6, 7 and 9) and R5X4 dual-mixed variant populations in the remaining four (patients 2, 5, 8 and 10). At baseline, minority X4 variants were found in patient 2 ( $n = 1$ : 1.1%), patient 5 ( $n = 3$ : 12.4%, 10.6%, 1.7%), patient 8 ( $n = 1$ : 12.4%) and patient 10 ( $n = 6$ : 5.8%, 2.6%, 1.4%, 1.3%, 1.2%, 1.0%).

During follow-up, three out of six patients who harboured a major R5-tropic variant displayed the emergence of dual R5X4-tropic quasispecies at month 6 (patients 1, 4 and 7). None of these patients harboured minority X4 variants at baseline. Patient 4's quasispecies reverted to R5 at month 12, and the X4 variants became dominant (>80% of the quasispecies) in the third sample for the remaining two (patients 1 and 7).

Only one patient (patient 5) with R5X4 dual-mixed quasispecies in PBMCs at baseline was treated with a CCR5 antagonist. For this patient, the proportion of X4 variants increased from 25.8% at baseline to 99.5% after 4 years on a maraviroc-containing SOT (patient 5; Figure 1a).

We observed two distinct evolution patterns for V3 loop sequences on efficient SOT. First, six patients (patients 1, 3, 5, 7, 9 and 10) harboured conserved variants over time (e.g. patients 10 and 3; Figure 1b and c) with small variations in their relative frequencies. Second, the remaining four patients (patients 2, 4, 6 and 8) had quasispecies with no identical sequence between baseline and the third sample, depicting pronounced fluctuations of variants (e.g. patient 6; Figure 1d).

The median Shannon entropy was 0.093 (range, 0.004–0.209) and 0.087 (range, 0.005–0.180) at baseline and on the last visit sample, respectively, showing no significant difference in diversity level over time ( $P > 0.05$ ). Also, there was no significant difference in diversity level between R5 and dual-mixed R5X4 quasispecies ( $P > 0.05$ ), with median entropy of 0.059 (range, 0.004–0.209) and 0.087 (range, 0.005–0.265), respectively.

### Longitudinal DRAMs in the PR/RT sequence archived in blood cells and variants by UDS

A median of two variants was detected in each sample, with 27% of minority variants. The number of variants per sample was significantly lower in PR/RT sequences than in V3 sequences; this observation was true when considering all variants ( $P < 0.001$ ) or only minority variants ( $P = 0.002$ ). Archived DRAMs were detected in all 29 samples, conferring resistance to the three major drug classes (NRTI, NNRTI and PI). PI DRAMs are shown in Table 2, with NRTI and NNRTI DRAMs in Table 3, and the dynamics between major DRAMs and the three drug classes are depicted in Figure 2. In all patients' quasispecies and at each timepoint, DRAMs to the three drug classes were linked on the same viral variant.

Concerning the dynamics of DRAMs archived in PBMCs, three distinct evolutionary patterns were observed.

- (i) First, some baseline DRAMs were still detectable during follow-up and were all linked on the same variant (patients 1, 2, 4 and 5). These DRAMs were generally related to persistent selective pressure by one or more drugs of the SOT. Indeed, patients 1, 2 and 4 had baseline viral DNA quasispecies considered resistant to at least one drug of the SOT. For example, patient 2 harboured at baseline a unique viral variant with PI, NRTI, and NNRTI DRAMs conferring resistance to



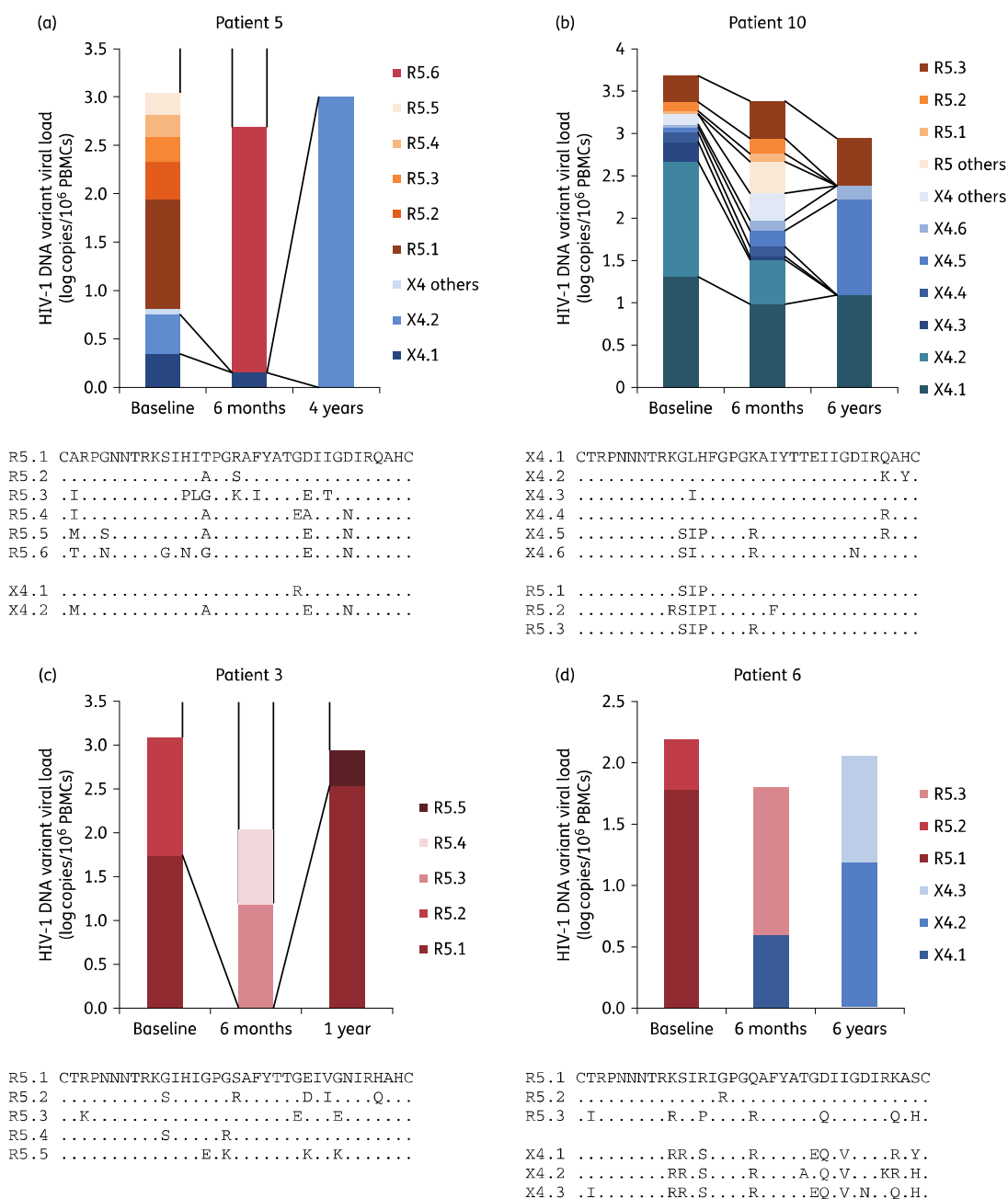
**Table 1.** Patient characteristics and V3 loop HIV-1 DNA variants observed in UDS

| Patient | HIV-1 subtype  | Visit    | Ongoing ART   | HIV-1 RNA (copies/mL) | CD4 T cell count (cells/mm <sup>3</sup> ) | HIV-1 DNA load (log <sub>10</sub> copies/10 <sup>6</sup> PBMCs) | V3 loop variants >1% (n) | Percentage X4 quasispecies (FPR 10% <sup>a</sup> ) |
|---------|----------------|----------|---|-----------------------|---|---|--------------------------|--|
| 1       | B              | day 0    | ddI + 3TC + FPV/r → FPV/r + FTC + TDF + NVP + T20   | 103000                | 189                                       | 3.52  | 6                        | <1   |
|         |                | month 6  | FPV/r + FTC + TDF + NVP + T20                       | <50                   | 308                                       | 3.47  | 16                       | 60.8   |
|         |                | month 12 | FPV/r + FTC + TDF + NVP + T20                       | <50                   | 406                                       | 3.30  | 6                        | 82.5   |
| 2       | B              | day 0    | SQV/r + ABC + 3TC + IDV → LPV/r + FPV/r + TDF + T20 | 164855                | 47  | 3.34  | 4                        | 91.9   |
|         |                | month 6  | LPV/r + FPV/r + TDF + T20                           | <50                   | 217                                       | 2.56  | 19                       | 57.8   |
|         |                | month 12 | LPV/r + FPV/r + TDF + T20                           | 307                   | 276                                       | 2.46  | 2                        | 96.7   |
| 3       | B              | day 0    | NVP + TDF + FPV/r → FPV/r + FTC + TPV + T20         | 53887                 | 69  | 3.47  | 2                        | 1.4  |
|         |                | month 6  | ABC + FPV/r + FTC + TPV + T20                       | <50                   | 214                                       | 3.12  | 5                        | <1   |
|         |                | month 12 | ABC + FPV/r + FTC + TPV + T20                       | <50                   | 119                                       | 3.26  | 3                        | <1   |
| 4       | B              | day 0    | ABC + 3TC + ZDV → ddI + EFV + TPV/r                 | 55574                 | 67  | 3.07  | 1                        | <1   |
|         |                | month 6  | ddI + EFV + FPV/r                                   | <50                   | 197                                       | 2.37  | 6                        | 78.9   |
|         |                | month 12 | ddI + EFV + FPV/r                                   | <50                   | 236                                       | 2.28  | 1                        | <1   |
| 5       | B              | day 0    | SQV + LPV/r → RAL + MVC                             | 1640                  | 527                                       | 3.27  | 9                        | 25.8   |
|         |                | month 6  | RAL + MVC → RAL + ETR + MVC                         | <50                   | 759                                       | 2.85  | 3                        | 5.9  |
|         |                | month 48 | ETR + RAL + MVC                                     | <50                   | 355                                       | 3.17  | 2                        | 99.5   |
| 6       | B              | day 0    | TPV/r + 3TC + ABC + TDF → ETR + RAL + DRV/r + T20   | 114294                | 551                                       | 2.74  | 3                        | 4.5  |
|         |                | month 48 | ETR + RAL + DRV/r                                   | <50                   | 738                                       | 2.58  | 6                        | 2.1  |
| 7       | B              | day 0    | TDF + ABC + LPV/r → RAL + ETR + DRV/r               | 4330                  | 39  | 2.35  | 3                        | <1   |
|         |                | month 6  | RAL + ETR + DRV/r                                   | <50                   | 102                                       | 1.89  | 2                        | 33.6   |
|         |                | month 72 | RAL + ETR + DRV/r                                   | <50                   | 336                                       | 2.20  | 2                        | 98.0   |
| 8       | B              | day 0    | EFV + TDF + ABC → ABC + TDF + DRV/r + T20           | 31000                 | 462                                       | 3.39  | 4                        | 63.2   |
|         |                | month 6  | ABC + TDF + DRV/r                                   | <50                   | 608                                       | 2.95  | 3                        | 99.7   |
|         |                | month 72 | TDF + FTC + RPV + ATV + RAL                         | <50                   | 557                                       | 2.64  | 3                        | 72.7   |
| 9       | A <sup>b</sup> | day 0    | LPV/r + TDF + ABC → DRV/r + ABC + RAL + T20         | 12300                 | 294                                       | 2.98  | 1                        | <1   |
|         |                | month 6  | RAL + DRV/r + ABC                                   | <50                   | 306                                       | 2.96  | 4                        | <1   |
|         |                | month 72 | RAL + DRV/r + ABC                                   | <50                   | 368                                       | 2.69  | 2                        | <1   |
| 10      | B              | day 0    | therapeutic interruption → RAL + DRV/r + TDF + FTC  | 65400                 | 294                                       | 4.19  | 11                       | 85.4   |
|         |                | month 6  | RAL + DRV/r + TDF + FTC                             | <50                   | 720                                       | 3.71  | 15                       | 67.9   |
|         |                | month 72 | RAL + TDF + FTC                                     | <50                   | 1075                                      | 3.20  | 4                        | 80.6   |

ABC, abacavir; ATV, atazanavir; ddI, didanosine; DRV, darunavir; EFV, efavirenz; ETR, etravirine; FPV, fosamprenavir; FTC, emtricitabine; 3TC, lamivudine; IDV, indinavir; LPV, lopinavir; MVC, maraviroc; NVP, nevirapine; RAL, raltegravir; RPV, rilpivirine; SQV, saquinavir; TDF, tenofovir disoproxil fumarate; TPV, tipranavir; T20, enfuvirtide; ZDV, zidovudine; /r, ritonavir boosted; →, switch.

<sup>a</sup>False-positive rate (FPR) set at 10%.

<sup>b</sup>Subtype A virus tropism was also predicted using geno2pheno.



**Figure 1.** Intra-patient dynamics of R5- and X4-using variants archived in blood cells over time. Longitudinal analysis of relative abundance (y-axis, viral DNA variant load) of R5 (red range) and X4 (blue range) variants over time (x-axis). For each patient, the V3 amino acid sequence of variants is shown. This figure appears in colour in the online version of JAC and in black and white in the print version of JAC.

lopinavir and intermediate resistance to tenofovir. Both lopinavir and tenofovir were part of the SOT, and the viral variant was still major after 1 year of successful treatment.

Although no NNRTI was used as part of SOT in this patient, NNRTI DRAMs (i.e. Y181C) were still detected throughout follow-up as they were linked on the same variant

**Table 2.** Longitudinal dynamics of archived PI DRAMs in blood cell HIV-1 DNA quasispecies

| Patient | Visit    | Ongoing ART   | PI DRAMs (% of quasispecies)  |
|---------|----------|---|---|
| 1       | day 0    | ddI + 3TC + FPV/r → FPV/r + FTC + TDF + NVP + T20   | <u>L10F (96.1)</u> , V11I (96.5), L24I (99.2), <u>L33F (96.2)</u> , M46L (95.4), <u>I54L (97.0)</u> , L63P (99.7), A71L (99.8), V82T (100), <u>I84V (100)</u>   |
|         | month 6  | FPV/r + FTC + TDF + NVP + T20                       | <u>L10F (97.2)</u> , V11I (97.5), L24I (98.8), <u>L33F (97.9)</u> , M46L (94.1), <u>I54L (70.9)</u> , L63P (100), A71L (97.8), V82T (100), <u>I84V (100)</u>  |
|         | month 12 | FPV/r + FTC + TDF + NVP + T20                       | <u>L10F (98.7)</u> , V11I (99.1), L24I (99.5), <u>L33F (98.6)</u> , M46L (99.3), <u>I54L (99.2)</u> , L63P (100), A71L (100), V82T (99.7), <u>I84V (100)</u>  |
| 2       | day 0    | SQV/r + ABC + 3TC + IDV → LPV/r + FPV/r + TDF + T20 | <u>L10I (99.6)</u> , <u>I15V (99.3)</u> , <u>K20T (99.8)</u> , <u>M46I (100)</u> , L63P (100), A71V (99.8), <u>V77I (100)</u> , <u>I84V (99.8)</u> , I85V (99.8), <u>L90M (99.7)</u>  |
|         | month 6  | LPV/r + FPV/r + TDF + T20                           | <u>L10I (99.4)</u> , <u>I15V (99.4)</u> , K20T (99.6), <u>M46I (99.6)</u> , <u>L63P (99.9)</u> , A71V (99.7), <u>V77I (100)</u> , <u>I84V (99.7)</u> , I85V (99.7), <u>L90M (99.7)</u>  |
|         | month 12 | LPV/r + FPV/r + TDF + T20                           | <u>L10I (99.3)</u> , <u>I15V (99.8)</u> , K20T (100), <u>M46I (100)</u> , <u>L63P (100)</u> , A71V (99.7), <u>V77I (100)</u> , <u>I84V (99.8)</u> , I85V (99.8), <u>L90M (99.5)</u>   |
| 3       | day 0    | NVP + TDF + FPV/r → FPV/r + FTC + TPV + T20         | G16E (33.2), V77I (100)   |
|         | month 6  | ABC + FPV/r + FTC + TPV + T20                       | <b>L63P (100)</b> , V77I (100)  |
|         | month 12 | ABC + FPV/r + FTC + TPV + T20                       | <b>L10I (100)</b> , <b>K20I (100)</b> , <b>L24I (99.4)</b> , <b>L33F (100)</b> , <b>M46I (99.7)</b> , <b>I54L (100)</b> , <b>L63P (100)</b> , <b>H69Y (100)</b> , <b>A71V (100)</b> , <b>G73T (99.9)</b> , V77I (99.9), <b>I84V (100)</b> |
| 4       | day 0    | ABC + 3TC + ZDV → ddI + EFV + TPV/r                 | L63P (100)  |
|         | month 6  | ddI + EFV + FPV/r                                   | <b>L10F (99.8)</b> , <b>M46I (100)</b> , <b>I62V (100)</b> , L63P (100), <b>A71V (100)</b> , <b>I84V (99.7)</b> , <b>L90M (99.7)</b>  |
| 5       | month 12 | ddI + EFV + FPV/r                                   | L63P (99.5)   |
|         | day 0    | SQV + LPV/r → RAL + MVC                             | <u>L10F (14.6)</u> , M36I (85.1), <u>M46I (14.1)</u> , H69K (99.6), <u>I84V (13.9)</u>  |
|         | month 6  | RAL + MVC → RAL + ETR + MVC                         | M36I (100), H69K (99.8)   |
| 6       | month 48 | ETR + RAL + MVC                                     | M36I (100), H69K (99.9)   |
|         | day 0    | TPV/r + 3TC + ABC + TDF → ETR + RAL + DRV/r + T20   | L10V (99.5), <u>D30N (7.1)</u> , <u>L33F (15.9)</u> , L33V (17.4), M36I (100), <u>M46I (16.3)</u> , <u>I47V (16.3)</u> , <u>I54V (16.0)</u> , L63P (100), A71V (7.5), V82T (16.1), <u>L90M (8.9)</u>                                      |
| 7       | month 48 | ETR + RAL + DRV/r                                   | L10V (99.9), M36I (100), L63P (97.8)  |
|         | day 0    | TDF + ABC + LPV/r → RAL + ETR + DRV/r               | NA  |
|         | month 6  | RAL + ETR + DRV/r                                   | M36V (83.0)   |
| 8       | month 72 | RAL + ETR + DRV/r                                   | <b>L10F (99.5)</b> , <b>K20T (99.5)</b> , <b>L33F (99.8)</b> , <b>M36I (100)</b> , <b>M46I (100)</b> , <b>I54V (99.7)</b> , <b>I62V (100)</b> , <b>L63P (100)</b> , <b>L76V (100)</b> , <b>V82A (99.8)</b>                                |
|         | day 0    | EFV + TDF + ABC → ABC + TDF + DRV/r + T20           | <u>L10I (64.4)</u> , <u>L24I (64.1)</u> , <u>M46I (62.6)</u> , <u>I54V (62.5)</u> , L63P (100), A71T (99.8), V77I (100), <u>V82A (61.5)</u>   |
|         | month 6  | ABC + TDF + DRV/r                                   | <b>I62V (99.4)</b> , L63P (100), A71T (99.7), V77I (100)  |
| 9       | month 72 | TDF + FTC + RPV + ATV + RAL                         | L63P (99.0), A71T (99.8), V77I (100)  |
|         | day 0    | LPV/r + TDF + ABC → DRV/r + ABC + RAL + T20         | <u>L10I (13.7)</u> , G16E (13.9), <u>K20I (14.0)</u> , M36I (99.5), <u>M46I (14.2)</u> , <u>I54V (14.2)</u> , <u>Q58E (14.4)</u> , H69K (85.2), <u>H69R (14.2)</u> , <u>L76V (14.2)</u> , <u>V82F (13.9)</u> , L89M (99.7)                |
|         | month 6  | RAL + DRV/r + ABC                                   | M36I (100), H69K (99.1), L89M (99.8)  |
| 10      | month 72 | RAL + DRV/r + ABC                                   | M36I (100), H69K (99.3), <b>G73S (16.6)</b> , L89M (99.7)   |
|         | day 0    | therapeutic interruption → RAL + DRV/r + TDF + FTC  | <u>L10V (81.7)</u> , <u>D30N (2.4)</u> , <u>L33F (1.8)</u> , <u>M46I (1.2)</u> , <u>I50V (2.2)</u> , L63P (98.9), A71T (2.2), G73S (1.0), V77I (38.9)   |
|         | month 6  | RAL + DRV/r + TDF + FTC                             | L63P (98.9)   |
|         | month 72 | RAL + TDF + FTC                                     | L33F (34.8), <b>M36I (65.1)</b> , I50V (34.7), L63P (100), A71T (34.4), G73S (65.2)   |

ABC, abacavir; ATV, atazanavir; ddI, didanosine; DRV, darunavir; EFV, efavirenz; ETR, etravirine; FPV, fosamprenavir; FTC, emtricitabine; 3TC, lamivudine; IDV, indinavir; LPV, lopinavir; MVC, maraviroc; NVP, nevirapine; RAL, raltegravir; RPV, rilpivirine; SQV, saquinavir; TDF, tenofovir disoproxil fumarate; TPV, tipranavir; T20, enfuvirtide; ZDV, zidovudine; /r, ritonavir boosted; →, switch; NA, not available.

Italic: mutations not detected in the third PBMC sample.

Bold: new mutations detected over time.

Underlined: mutations associated with prescribed treatment. Square brackets: available UDS results when not all B, C and D amplicons could be amplified.

harbouring lopinavir and tenofovir DRAMs. However, this patient had an important HIV-1 DNA load decrease over time ( $-0.88 \log_{10}$  copies/ $10^6$  PBMCs within a year on SOT),

which resulted also in a reduced resistant viral DNA load ( $3.34 \log_{10}$  copies/ $10^6$  PBMCs at baseline versus  $2.36 \log_{10}$  copies/ $10^6$  PBMCs at month 12).

**Table 3.** Longitudinal dynamics of archived NRTI and NNRTI DRAMs in blood cell HIV-1 DNA quasiespecies

| Patient | Visit    | Ongoing ART                                | NRTI DRAMs (% of quasiespecies)   | NNRTI DRAMs (% of quasiespecies)                |
|---------|----------|--|---|---|
| 1       | day 0    | ddI+3TC+FPV/r→FPV/r+FTC+TDF+NVP+T20        | <u>D67N (99.6), T69D (99.7), M184V (95.2), L210W (100), T215Y (99.4)</u>  | <u>V106A (4.7)</u>                              |
|         | month 6  | FPV/r+FTC+TDF+NVP+T20                      | <u>D67N (98.9), T69D (100), M184V (98.5), L210W (100), T215Y (99.6)</u>   | <b>M230I (14.4)</b>                             |
|         | month 12 | FPV/r+FTC+TDF+NVP+T20                      | <u>D67N (99.4), T69D (100), M184V (98.5), L210W (99.5), T215Y (99.2)</u>  | none  |
| 2       | day 0    | SQV/r+ABC+3TC+IDV→LPV/r+FPV/r+TDF+T20      | <u>M41L (99.8), L74V (99.5), M184V (99.5), L210W (99.5), T215Y (99.9)</u>   | K101E (98.8), Y181C (99.5), G190A (99.5)        |
|         | month 6  | LPV/r+FPV/r+TDF+T20                        | NA  | NA  |
|         | month 12 | LPV/r+FPV/r+TDF+T20                        | <u>M41L (99.7), L74V (99.5), M184V (99.9), L210W (100), T215Y (100)</u>   | K101E (99.9), Y181C (99.9), G190A (99.9)        |
| 3       | day 0    | NVP+TDF+FPV/r→FPV/r+FTC+TPV+T20            | [amplicons B and C: none]   | [amplicons B and C: A98S (100)]                 |
|         | month 6  | ABC+FPV/r+FTC+TPV+T20                      | none  | none  |
|         | month 12 | ABC+FPV/r+FTC+TPV+T20                      | <b>K70R (99.4)</b>  | none  |
| 4       | day 0    | ABC+3TC+ZDV→ddI+EFV+TPV/r                  | <u>M41L (99.4), E44D (99.4), D67N (97.6), M184V (99.9), L210W (99.9), T215Y (99.9)</u>                                    | A98S (98.9), V179I (21.0)                       |
|         | month 6  | ddI+EFV+FPV/r                              | <u>M41L (100), E44D (100), D67N (98.7), M184V (100), L210W (100), T215Y (99.7)</u>  | A98S (100)                                      |
|         | month 12 | ddI+EFV+FPV/r                              | <u>M41L (100), E44D (88.7), D67N (86.6), M184V (99.8), L210W (99.8), T215Y (99.8)</u>                                     | A98S (99.6)                                     |
| 5       | day 0    | SQV+LPV/r→RAL+MVC                          | M41L (99.4), D67N (52.4), K70R (53.7), M184I (72.8), L210W (74.2), T215C (24.1), T215Y (73.5), K219Q (68.0)               | V90I (100), A98S (15.7)                         |
|         | month 6  | RAL+MVC→RAL+ETR+MVC                        | M41L (26.9), T215Y (59.2)   | none  |
|         | month 48 | ETR+RAL+MVC                                | M41L (99.7), <b>E44D (99.4)</b> , D67N (99.4), <b>T69D (99.3)</b> , K70R (98.4), M184I (99.7), L210W (99.3), T215Y (99.3) | <b>G190R (100), M230I (99.9)</b>                |
| 6       | day 0    | TPV/r+3TC+ABC+TDF→ETR+RAL+DRV/r+T20        | none  | A98S (100), M230I (5.8)                         |
|         | month 48 | ETR+RAL+DRV/r                              | none  | A98S (99.9)                                     |
| 7       | day 0    | TDF+ABC+LPV/r→RAL+ETR+DRV/r                | [amplicon D: T215Y (30.8)]  | [amplicon D: none]                              |
|         | month 6  | RAL+ETR+DRV/r                              | K70R (87.6), T215Y (87.0)   | <u>A98G (86.2)</u>                              |
|         | month 72 | RAL+ETR+DRV/r                              | <b>M41L (98.8), D67N (99.4), L210W (99.8), T215Y (99.3)</b>   | <u>A98G (99.5), L100I (98.5), K103N (99.0)</u>  |
| 8       | day 0    | EFV+TDF+ABC→ABC+TDF+DRV/r+T20              | <u>D67N (64.1), K70R (66.5), T215I (55.3), K219E (55.7)</u>   | <u>K103N (71.3), Y181C (55.0)</u>               |
|         | month 6  | ABC+TDF+DRV/r                              | none  | none  |
|         | month 72 | TDF+FTC+RPV+ATV+RAL                        | [amplicons B and D: none]   | [amplicons B and D: none]                       |
| 9       | day 0    | LPV/r+TDF+ABC→DRV/r+ABC+RAL+T20            | <u>M41L (99.7), D67N (99.5), L210W (99.4), T215Y (99.1)</u>   | A98G (99.4), L100I (99.0), K103N (99.2)         |
|         | month 6  | RAL+DRV/r+ABC                              | <u>L210W (1.5), T215Y (1.5)</u>   | <b>K101E (1.8)</b>                              |
|         | month 72 | RAL+DRV/r+ABC                              | none  | none  |
| 10      | day 0    | therapeutic interruption→RAL+DRV/r+TDF+FTC | <u>M184V (4.7), T215F (4.5)</u>   | Y181C (4.7)                                     |
|         | month 6  | RAL+DRV/r+TDF+FTC                          | <b>M41L (6.2), M184I (98.0)</b>   | <b>E138K (98.7), G190R (97.9), M230I (98.1)</b> |
|         | month 72 | RAL+TDF+FTC                                | [amplicon C: <b>K65R (1.9)</b> ]  | [amplicon C: none]                              |

ABC, abacavir; ATV, atazanavir; ddI, didanosine; DRV, darunavir; EFV, efavirenz; ETR, etravirine; FPV, fosamprenavir; FTC, emtricitabine; 3TC, lamivudine; IDV, indinavir; LPV, lopinavir; MVC, maraviroc; NVP, nevirapine; RAL, raltegravir; RPV, rilpivirine; SQV, saquinavir; TDF, tenofovir disoproxil fumarate; TPV, tipranavir; T20, enfuvirtide; ZDV, zidovudine; /r, ritonavir boosted; →, switch; NA, not available.

Italic: mutations not detected in the third PBMC sample.

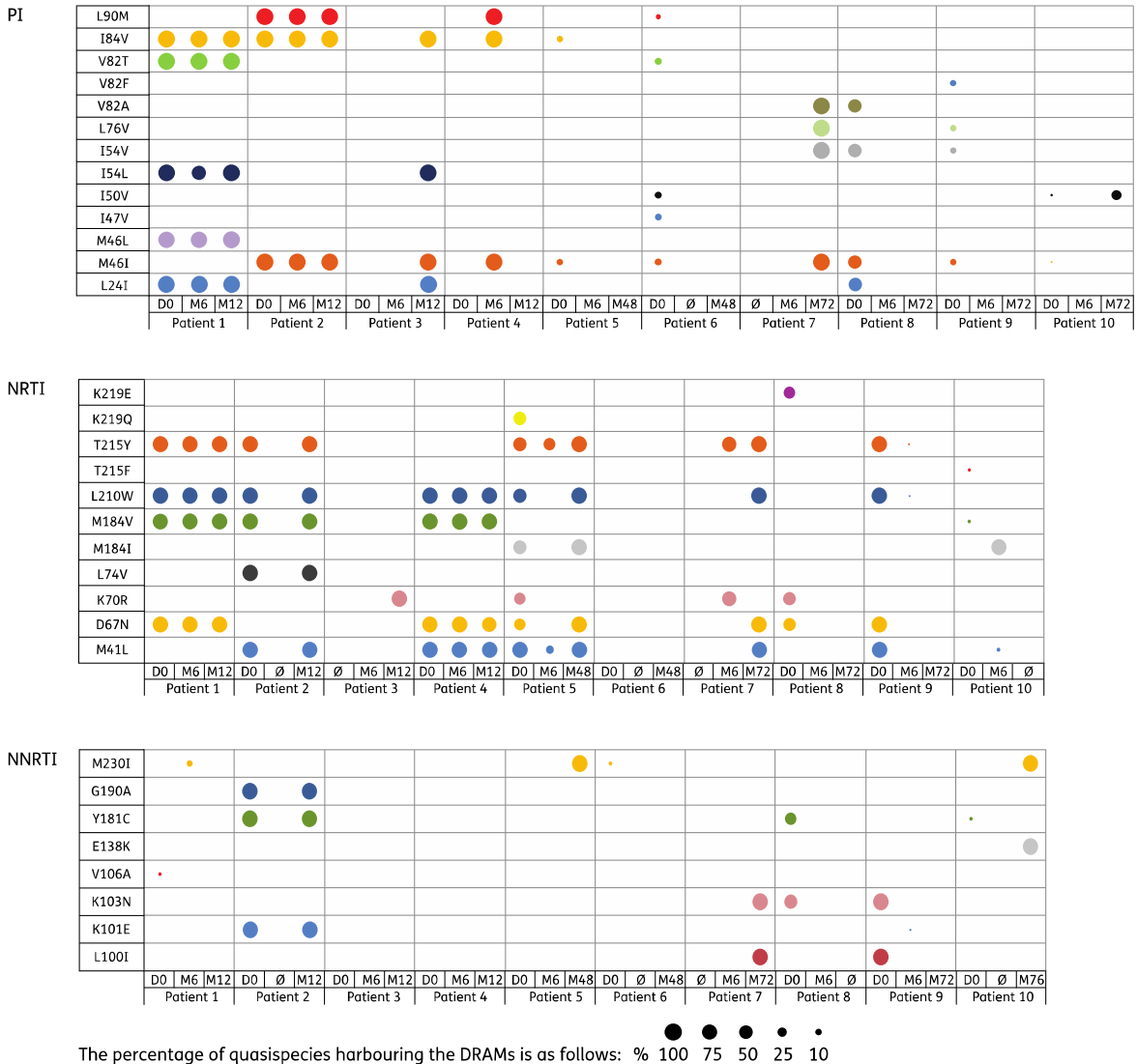
Bold: new mutations detected over time.

Underlined: mutations associated with prescribed treatment.

(ii) Second, some baseline variants with linked DRAMs were no longer detectable through follow-up on efficient SOT (patients 3, 6, 8, 9 and 10). In these cases, DRAMs were not related to drugs in the SOT. In patients 3, 6, 8 and 9, no variant harboured DRAMs to any of the drugs in the SOT, according to baseline UDS viral DNA genotypes. For example, patient

8 had a major variant (approximately 60% of the archived quasispecies) harbouring DRAMs to the three drug classes (i.e. NRTI: D67N, K70R, K219E; NNRTI: K103N, Y181C; PI: L24I, M46I, I54V, V82A). This variant was no longer detectable as of month 6 of follow-up. These DRAMs were not related to the SOT. The other variants found in this patient

(a)



**Figure 2.** (a) Intra-patient dynamics of major PI, NRTI and NNRTI DRAMs archived in blood cells over time. Longitudinal analysis of percentage of quasispecies harbouring major PI, NRTI and NNRTI DRAMs (y-axis, mutations) by patient over time (x-axis, months). (b) Longitudinal analysis of resistant viral DNA load ( $\log_{10}$  copies/ $10^6$  PBMCs) of quasispecies harbouring major PI, NRTI and NNRTI DRAMs (y-axis, mutations) by patient over time (x-axis, months). The resistant viral DNA loads of quasispecies harbouring the DRAMs are depicted from red (high level) to green (low level), with blue in the case of lack of detection and grey in the case of lack of amplification. D, day; M, month;  $\phi$ , unsuccessful amplification. This figure appears in colour in the online version of *JAC* and in black and white in the print version of *JAC*.

(b) Resistant viral DNA load (log<sub>10</sub> copies/10<sup>6</sup> PBMCs)

| PI    | Patient 1 |      |      | Patient 2 |      |      | Patient 3 |      |      | Patient 4 |      |      | Patient 5 |      |      | Patient 6 |    |      | Patient 7 |    |      | Patient 8 |      |      | Patient 9 |      |      | Patient 10 |      |      |      |      |
|-------|-----------|------|------|-----------|------|------|-----------|------|------|-----------|------|------|-----------|------|------|-----------|----|------|-----------|----|------|-----------|------|------|-----------|------|------|------------|------|------|------|------|
|       | Visit     | D0   | M6   | M12       | D0   | M6   | M12       | D0   | M6   | M12       | D0   | M6   | M12       | D0   | M6   | M48       | D0 | ∅    | M48       | ∅  | M6   | M72       | D0   | M6   | M72       | D0   | M6   | M72        | D0   | M6   | M72  |      |
| L24I  | 3.49      | 3.43 | 3.28 |           |      |      | 0.00      | 0.00 | 3.24 |           |      |      |           |      |      |           |    |      |           |    |      | 2.17      | 0.00 | 0.00 |           |      |      |            |      |      |      |      |
| M46I  |           |      |      | 3.34      | 2.55 | 2.46 | 0.00      | 0.00 | 3.25 | 0.00      | 2.37 | 0.00 | 0.46      | 0.00 | 0.00 | 0.45      |    |      |           |    |      | 0.00      | 2.20 | 2.12 | 0.00      | 0.00 | 0.42 | 0.00       | 0.00 | 0.05 | 0.00 | 0.00 |
| M46L  | 3.36      | 3.27 | 3.28 |           |      |      |           |      |      |           |      |      |           |      |      |           |    |      |           |    |      |           |      |      |           |      |      |            |      |      |      |      |
| I47V  |           |      |      |           |      |      |           |      |      |           |      |      |           |      |      | 0.45      |    | 0.00 |           |    |      |           |      |      |           |      |      |            |      |      |      |      |
| I50V  |           |      |      |           |      |      |           |      |      |           |      |      |           |      |      | 0.44      |    | 0.00 |           |    |      |           |      |      |           |      |      |            | 0.09 | 0.00 | 1.11 |      |
| I54L  | 3.41      | 2.46 | 3.27 |           |      |      | 0.00      | 0.00 | 3.26 |           |      |      |           |      |      |           |    |      |           |    |      |           |      |      |           |      |      |            |      |      |      |      |
| I54V  |           |      |      |           |      |      |           |      |      |           |      |      |           |      |      |           |    |      |           |    |      | 0.00      | 2.19 | 2.12 | 0.00      | 0.00 | 0.42 | 0.00       | 0.00 |      |      |      |
| L76V  |           |      |      |           |      |      |           |      |      |           |      |      |           |      |      |           |    |      |           |    |      | 0.00      | 2.20 |      |           | 0.42 | 0.00 | 0.00       |      |      |      |      |
| V82A  |           |      |      |           |      |      |           |      |      |           |      |      |           |      |      |           |    |      |           |    |      | 0.00      | 2.20 | 2.08 | 0.00      | 0.00 |      |            |      |      |      |      |
| V82F  |           |      |      |           |      |      |           |      |      |           |      |      |           |      |      |           |    |      |           |    |      |           |      |      |           |      | 0.41 | 0.00       | 0.00 |      |      |      |
| V82T  | 3.52      | 3.47 | 3.27 |           |      |      |           |      |      |           |      |      |           |      |      | 0.44      |    | 0.00 |           |    |      |           |      |      |           |      |      |            |      |      |      |      |
| I84V  | 3.52      | 3.47 | 3.30 | 3.33      | 2.55 | 2.46 | 0.00      | 0.00 | 3.26 | 0.00      | 2.36 | 0.00 | 0.45      | 0.00 | 0.00 |           |    |      |           |    |      |           |      |      |           |      |      |            |      |      |      |      |
| L90M  |           |      |      | 3.33      | 2.55 | 2.45 |           |      |      |           | 0.00 | 2.36 | 0.00      |      |      |           |    |      |           |    |      |           |      |      |           |      |      |            |      |      |      |      |
| NRTI  | Patient 1 |      |      | Patient 2 |      |      | Patient 3 |      |      | Patient 4 |      |      | Patient 5 |      |      | Patient 6 |    |      | Patient 7 |    |      | Patient 8 |      |      | Patient 9 |      |      | Patient 10 |      |      |      |      |
| Visit | D0        | M6   | M12  | D0        | ∅    | M12  | D0        | M6   | M12  | D0        | M6   | M12  | D0        | M6   | M48  | D0        | ∅  | M48  | ∅         | M6 | M72  | D0        | M6   | M72  | D0        | M6   | M72  | D0         | M6   | M72  |      |      |
| M41L  |           |      |      | 3.33      |      | 2.45 |           |      |      | 0.09      | 2.37 | 2.28 | 3.25      | 0.77 | 3.16 |           |    |      |           |    | 0.00 | 2.17      |      |      | 2.97      | 0.00 | 0.00 | 0.00       | 0.23 |      |      |      |
| D67N  | 3.51      | 3.43 | 3.28 |           |      |      |           |      |      | 0.09      | 2.34 | 1.97 | 1.71      | 3.15 |      |           |    |      |           |    | 0.00 | 2.19      | 2.17 | 0.00 | 0.00      | 2.97 | 0.00 | 0.00       |      |      |      |      |
| K70R  |           |      |      |           |      |      | 0.00      | 3.24 |      |           |      |      | 1.76      |      |      |           |    |      |           |    | 1.66 | 0.00      | 2.25 | 0.00 | 0.00      |      |      |            |      |      |      |      |
| L74V  |           |      |      | 3.32      |      | 2.45 |           |      |      |           |      |      |           |      |      |           |    |      |           |    |      |           |      |      |           |      |      |            |      |      |      |      |
| M184I |           |      |      |           |      |      |           |      |      |           |      |      |           | 2.38 | 3.16 |           |    |      |           |    |      |           |      |      |           |      |      | 0.00       | 3.64 |      |      |      |
| M184V | 3.35      | 3.42 | 3.25 | 3.32      |      | 2.46 |           |      |      | 0.09      | 2.37 | 2.28 |           |      |      |           |    |      |           |    |      |           |      |      |           |      |      | 0.20       | 0.00 |      |      |      |
| L210W | 3.52      | 3.47 | 3.28 | 3.32      |      | 2.46 |           |      |      | 0.09      | 2.36 | 2.28 | 2.43      | 3.15 |      |           |    |      |           |    | 0.00 | 2.20      |      |      | 2.96      | 0.04 | 0.00 |            |      |      |      |      |
| T215F |           |      |      |           |      |      |           |      |      |           |      |      |           |      |      |           |    |      |           |    |      |           |      |      |           |      |      | 0.19       | 0.00 |      |      |      |
| T215Y | 3.50      | 3.46 | 3.27 | 3.34      |      | 2.46 |           |      |      |           |      |      | 2.40      | 1.69 | 3.15 |           |    |      |           |    | 1.64 | 2.18      |      |      | 2.95      | 0.04 | 0.00 |            |      |      |      |      |
| K219Q |           |      |      |           |      |      |           |      |      |           |      |      | 2.22      | 0.00 | 0.00 |           |    |      |           |    |      |           |      |      |           |      |      |            |      |      |      |      |
| K219E |           |      |      |           |      |      |           |      |      |           |      |      |           |      |      |           |    |      |           |    |      |           |      |      | 1.89      | 0.00 | 0.00 |            |      |      |      |      |
| NNRTI | Patient 1 |      |      | Patient 2 |      |      | Patient 3 |      |      | Patient 4 |      |      | Patient 5 |      |      | Patient 6 |    |      | Patient 7 |    |      | Patient 8 |      |      | Patient 9 |      |      | Patient 10 |      |      |      |      |
| Visit | D0        | M6   | M12  | D0        | ∅    | M12  | D0        | M6   | M12  | D0        | M6   | M12  | D0        | M6   | M48  | D0        | ∅  | M48  | ∅         | M6 | M72  | D0        | M6   | ∅    | D0        | M6   | M72  | D0         | ∅    | M76  |      |      |
| L100I |           |      |      |           |      |      |           |      |      |           |      |      |           |      |      |           |    |      |           |    | 0.00 | 2.17      |      |      |           | 2.95 | 0.00 | 0.00       |      |      |      |      |
| K101E |           |      |      | 3.30      |      | 2.46 |           |      |      |           |      |      |           |      |      |           |    |      |           |    |      |           |      |      | 0.00      | 0.05 | 0.00 |            |      |      |      |      |
| K103N |           |      |      |           |      |      |           |      |      |           |      |      |           |      |      |           |    |      |           |    | 0.00 | 2.18      | 2.42 | 0.00 |           | 2.96 | 0.00 | 0.00       |      |      |      |      |
| V106A | 0.17      | 0.00 | 0.00 |           |      |      |           |      |      |           |      |      |           |      |      |           |    |      |           |    |      |           |      |      |           |      |      |            |      |      |      |      |
| E138K |           |      |      |           |      |      |           |      |      |           |      |      |           |      |      |           |    |      |           |    |      |           |      |      |           |      |      | 0.00       |      | 3.16 |      |      |
| Y181C |           |      |      | 3.32      |      | 2.46 |           |      |      |           |      |      |           |      |      |           |    |      |           |    |      |           |      |      | 1.86      | 0.00 |      | 0.20       | 0.00 |      |      |      |
| G190A |           |      |      | 3.32      |      | 2.46 |           |      |      |           |      |      |           |      |      |           |    |      |           |    |      |           |      |      |           |      |      |            |      |      |      |      |
| M230I | 0.00      | 0.50 | 0.00 |           |      |      |           |      |      |           |      |      | 0.00      | 0.00 | 3.17 | 0.16      |    | 0.00 |           |    |      |           |      |      |           |      |      | 0.00       |      | 3.14 |      |      |

Figure 2. Continued.

harboured no DRAM. Also, resistant viral DNA load at baseline was significantly higher ( $P=0.05$ ) for patients harbouring quasispecies in which viral DNA DRAMs were still detectable over the follow-up period (patients 1, 2, 4 and 5; median, 3.21 log<sub>10</sub> copies/10<sup>6</sup> PBMCs; range, 2.39–3.52 log<sub>10</sub> copies/10<sup>6</sup> PBMCs) than for those with no detectable viral DNA DRAMs over time (patients 6, 8, 9 and 10; median, 1.32 log<sub>10</sub> copies/10<sup>6</sup> PBMCs; range, 0.17–2.98 log<sub>10</sub> copies/10<sup>6</sup> PBMCs).

- (iii) Third, variants with new DRAMs (not detected at baseline) were detected throughout follow-up, despite sustained suppression of HIV-1 RNA in plasma (patients 3, 5, 7 and 10). Drugs in the SOT may have selected for these variants harbouring these additional DRAMs. In patients 3, 5, 7 and 10, the new resistance patterns were present on major variants of the archived quasispecies. For example, patient 7 harboured a major L100I and L76V viral variant after 6 years on an etravirine- and darunavir-containing SOT.

Resistant viral DNA load varied according to the size of the total cell-associated HIV-1 DNA level (Figure 2b). Most emerging and persisting DRAMs were detected with a high resistant viral DNA load (>2 log<sub>10</sub> copies/10<sup>6</sup> PBMCs; patients 1, 2, 3, 4, 5, 7 and 10). Conversely, variants no longer detected at the last visit were mostly present at a low resistant load at baseline (<2 log<sub>10</sub> copies/10<sup>6</sup> PBMCs; patients 6, 8, 9 and 10).

## Discussion

The presence of HIV drug-resistant variants poses a significant challenge to effective therapeutic intervention at any stage of infection, including that in patients under suppressive ART. Additionally, the role of past DRAMs evidenced in plasma in heavily ART-experienced patients must be taken into account for any treatment modification. Using UDS techniques on longitudinal PBMC samples of patients who were enrolled in the INNOVE and ANRS 123 ETOILE studies, who harboured multiresistant quasispecies and who achieved virological control on SOT, we showed that archived DRAMs can still be detectable in the cellular reservoir for lengthy periods of time, i.e. up to 6 years. Compared with Sanger sequencing, UDS provided a better sensitivity (1%), a relative abundance of quasispecies harbouring DRAMs and an analysis of linked mutations on the same viral variant. So, focusing on viral variants, we showed that the persistence of DRAMs depends on their association with the same viral variant. Moreover, new resistant variants with additional resistance mutations in the cellular reservoir that were not detected at baseline can be detected during follow-up despite fully and prolongedly effective ART. Combined tropism and DRAMs data confirmed that HIV-1 DNA archived quasispecies in PBMCs continue to evolve despite sustained virological control.

V3 loop sequences showed wide intra-individual variability over time, with multiple scenarios for the evolution of archived viral quasispecies. Three patients who harboured a major R5-tropic variant displayed the emergence of dual R5X4-tropic

quasispecies. This scenario may be due to a heavy selective pressure from immune system recovery on effective ART<sup>26</sup> and also to the SOT regimen composition.<sup>27</sup> Indeed, in one patient with dual-mixed R5X4 DNA quasispecies at baseline, X4 variants were selected after 4 years on a maraviroc-containing regimen, despite virological control.

We used resistance mutations in PR and RT genes to assess the dynamics of viruses archived in blood cells. Despite the usual dynamic processes affecting the pool of infected cells, some HIV-1 DNA samples isolated from PBMCs far from SOT initiation and under long-term virological control still exhibited the same DRAMs as at the time of virological failure. This finding indicates that resistant variants that entered the cellular reservoir during past virological failures persisted and were not replaced.<sup>28</sup> In this case, persistence of resistant variants was associated with ongoing selective pressure due to the composition of SOT on at least some linked mutations. We hypothesized that the mutated viral variant was able to replicate at low levels and so remained archived over time, while the remaining active drugs were able to achieve plasma virological control. Since DRAMs were mostly associated with the same viral variant, the complete resistance profile was maintained. The long-time persistence of these archived variants can be explained by the characteristics of target cells, particularly the central memory CD4 T cells with high proliferative capacity and long half-life.<sup>8,9</sup> Conversely, some viral variants harbouring major DRAMs were no longer detected in blood cells over time when the SOT regimen consisted of drugs from new classes or with a distinct resistance profile. Such a loss of detection of archived resistant variants may be due to the detection limit of very rare variants or to a dilution effect over time: with the death of cells harbouring those variants, the viral burden of these variants will probably be lower than that in cases with persistency. Immunological pressure in the absence of the selective pressure of the corresponding drug might also play a role in this (apparent) loss of viral variants. Whether such a phenomenon could allow reuse of drugs with resistance history remains very elusive.

Interestingly, variants with new DRAMs associated with SOT appeared during follow-up in patients who had achieved sustained virological control as early as 12 weeks after SOT initiation. This finding suggests that new viral quasispecies may be archived in blood cells despite effective ART. These new variants have most probably been selected directly in the blood compartment: indeed, routine assays for HIV-1 RNA measurement have a quantification limit of 20–50 copies/mL, but almost half of the patients under suppressive ART have a residual viraemia between 1 and 50 copies/mL that can persist for a long time.<sup>29,30</sup> This residual replication, in combination with drug pressure, might have selected for viruses with new DRAMs.<sup>31</sup> Unfortunately, we did not have enough available plasma to perform an ultrasensitive HIV-1 RNA measurement technique in the present study. Besides, viral variants harbouring these new DRAMs might pre-exist at very low levels or might have been selected in other reservoirs such as lymph nodes, the gut or the genital tract,<sup>4–6</sup> because of insufficient drug penetration in these compartments.<sup>32</sup> Some of these new DRAMs were G-to-A mutations (i.e. E138K and M230I in RT, patient 10), implicating APOBEC3 editing in the emergence of archived DRAMs in blood cells.<sup>33</sup> Although no stop codons were detected, indicating viability of these viral variants, the new DRAMs did not contribute to subsequent virological

failure. The clinical relevance of appearing DNA DRAMs on successful ART has to be investigated.

Moreover, resistant viral DNA load varied also according to the size of the HIV reservoir. Given that most patients experienced an important decrease in cell-associated HIV-1 DNA level over time, the resistant viral DNA load decreased as well. Besides, the resistant viral DNA load might play a role in the blood viral quasispecies dynamics: high levels led to variants' persistence whereas low levels led to variants' lack of detection after lengthy periods of controlled viraemia. These resistant HIV-1 DNA loads could influence the efficacy of new ART with cross-resistance or reused ART.

In conclusion, this study is the first to use the UDS technique to assess the longitudinal dynamics of viral resistant quasispecies archived in blood cells of heavily pretreated patients harbouring multiresistant virus and achieving sustained virological control for a prolonged period of time. Using DRAMs and tropism as markers, we demonstrated that, despite virological control, the diversity of the quasispecies continued to evolve. We showed that archived virus with DRAMs can persist for lengthy periods of time, which should be taken into account when modifying ART, even after many years of virological suppression.

## Funding

The ANRS 123 ETOILE study was supported by the ANRS (Agence Nationale de Recherche sur le SIDA et les Hépatites Virales, Paris, France), and the INNOVE study was supported by Roche Laboratories, France. For the present substudy, we received a grant from Roche Laboratories, France. The funders had no role in the study design, data collection and analysis, decision to publish or preparation of the manuscript.

## Transparency declarations

None to declare.

## References

- Wirden M, Soulie C, Valantin MA et al. Historical HIV-RNA resistance test results are more informative than proviral DNA genotyping in cases of suppressed or residual viraemia. *J Antimicrob Chemother* 2011; **66**: 709–12.
- Delaugerre C, Braun J, Charreau I et al. Comparison of resistance mutation patterns in historical plasma HIV RNA genotypes with those in current proviral HIV DNA genotypes among extensively treated patients with suppressed replication. *HIV Med* 2012; **13**: 517–25.
- Chun TW, Finzi D, Margolick J et al. In vivo fate of HIV-1-infected T cells: quantitative analysis of the transition to stable latency. *Nat Med* 1995; **1**: 1284–90.
- Ghoshn J, Viard JP, Katlama C et al. Evidence of genotypic resistance diversity of archived and circulating viral strains in blood and semen of pre-treated HIV-infected men. *AIDS* 2004; **18**: 447–57.
- Anderson JA, Ping LH, Dibben O et al. HIV-1 populations in semen arise through multiple mechanisms. *PLoS Pathog* 2010; **6**: e1001053.
- Avettand-Fenoel V, Hocqueloux L, Müller-Trutwin M et al. Greater diversity of HIV DNA variants in the rectum compared to variants in the blood in patients without HAART. *J Med Virol* 2011; **83**: 1499–507.
- Lambotte O, Demoustier A, de Goër MG et al. Persistence of replication-competent HIV in both memory and naive CD4 T cell subsets in patients on prolonged and effective HAART. *AIDS* 2002; **16**: 2151–7.

- 8** Chomont N, El-Far M, Ancuta P *et al.* HIV reservoir size and persistence are driven by T cell survival and homeostatic proliferation. *Nat Med* 2009; **15**: 893–900.
- 9** Appay V, van Lier RA, Sallusto F *et al.* Phenotype and function of human T lymphocyte subsets: consensus and issues. *Cytometry A* 2008; **73**: 975–83.
- 10** Halvas EK, Aldrovandi GM, Balfe P *et al.* Blinded, multicenter comparison of methods to detect a drug-resistant mutant of human immunodeficiency virus type 1 at low frequency. *J Clin Microbiol* 2006; **44**: 2612–4.
- 11** Metzner KJ, Bonhoeffer S, Fischer M *et al.* Emergence of minor populations of human immunodeficiency virus type 1 carrying the M184V and L90M mutations in subjects undergoing structured treatment interruptions. *J Infect Dis* 2003; **188**: 1433–43.
- 12** Metzner KJ, Rauch P, von Wyl V *et al.* Efficient suppression of minority drug-resistant HIV type 1 (HIV-1) variants present at primary HIV-1 infection by ritonavir-boosted protease inhibitor-containing antiretroviral therapy. *J Infect Dis* 2010; **201**: 1063–71.
- 13** Paredes R, Marconi VC, Campbell TB *et al.* Systematic evaluation of allele-specific real-time PCR for the detection of minor HIV-1 variants with *pol* and *env* resistance mutations. *J Virol Methods* 2007; **146**: 136–46.
- 14** Cozzi-Lepri A, Noguera-Julian M, Di Giallonardo F *et al.* Low-frequency drug-resistant HIV-1 and risk of virological failure to first-line NNRTI-based ART: a multicohort European case-control study using centralized ultrasensitive 454 pyrosequencing. *J Antimicrob Chemother* 2015; **70**: 930–40.
- 15** Charpentier C, Lee GQ, Rodriguez C *et al.* Highly frequent HIV-1 minority resistant variants at baseline of the ANRS 139 TRIO trial had a limited impact on virological response. *J Antimicrob Chemother* 2015; **70**: 2090–6.
- 16** Nicot F, Sauné K, Raymond S *et al.* Minority resistant HIV-1 variants and the response to first-line NNRTI therapy. *J Clin Virol* 2015; **62**: 20–4.
- 17** Morand-Joubert L, Ghosn J, Delaugerre C *et al.* Lack of benefit of 3-month intensification with enfuvirtide plus optimized background regimen (OBR) versus OBR alone in patients with multiple therapeutic failures: the INNOVE study. *J Med Virol* 2012; **84**: 1710–8.
- 18** Viard JP, Fagard C, Chaix ML *et al.* Immunological success is predicted by enfuvirtide but not interleukin-2 therapy in immunodepressed patients. *AIDS* 2009; **23**: 1383–8.
- 19** Avettand-Fenoel V, Chaix ML, Blanche S *et al.* LTR real-time PCR for HIV-1 DNA quantitation in blood cells for early diagnosis in infants born to seropositive mothers treated in HAART area (ANRS CO 01). *J Med Virol* 2009; **81**: 217–23.
- 20** Avidor B, Girshengorn S, Matus N *et al.* Evaluation of a benchtop HIV ultradeep pyrosequencing drug resistance assay in the clinical laboratory. *J Clin Microbiol* 2013; **51**: 880–6.
- 21** Raymond S, Saliou A, Delobel P *et al.* Evolution of HIV-1 quasispecies and coreceptor use in cell reservoirs of patients on suppressive antiretroviral therapy. *J Antimicrob Chemother* 2014; **69**: 2527–30.
- 22** Sede MM, Moretti FA, Laufer NL *et al.* HIV-1 tropism dynamics and phylogenetic analysis from longitudinal ultra-deep sequencing data of CCR5- and CXCR4-using variants. *PLoS One* 2014; **9**: e102857.
- 23** Di Giallonardo F, Zagordi O, Duport Y *et al.* Next-generation sequencing of HIV-1 RNA genomes: determination of error rates and minimizing artificial recombination. *PLoS One* 2013; **8**: e74249.
- 24** Nicot F, Saliou A, Raymond S *et al.* Minority variants associated with resistance to HIV-1 nonnucleoside reverse transcriptase inhibitors during primary infection. *J Clin Virol* 2012; **55**: 107–13.
- 25** Avettand-Fenoel V, Bouteloup V, Mèlard A *et al.* Higher HIV-1 DNA associated with lower gains in CD4 cell count among patients with advanced therapeutic failure receiving optimized treatment (ANRS 123-ETOILE). *J Antimicrob Chemother* 2010; **65**: 2212–4.
- 26** Harouse JM, Buckner C, Gettine A *et al.* CD8+ T cell-mediated CXCR4 chemokine receptor 4-simian/human immunodeficiency virus suppression in dually infected rhesus macaques. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; **100**: 10977–82.
- 27** Charpentier C, Joly V, Ghosn J *et al.* Change in HIV-1 DNA tropism despite virological success in patients receiving an enfuvirtide-based regimen. *J Antimicrob Chemother* 2014; **69**: 2588–90.
- 28** Strain MC, Günthard HF, Havlir DV *et al.* Heterogeneous clearance rates of long-lived lymphocytes infected with HIV: intrinsic stability predicts life-long persistence. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; **100**: 4819–24.
- 29** Doyle T, Smith C, Vitiello P *et al.* Plasma HIV-1 RNA detection below 50 copies/ml and risk of virologic rebound in patients receiving highly active antiretroviral therapy. *Clin Infect Dis* 2012; **54**: 724–32.
- 30** Palmer S, Maldarelli F, Wiegand A *et al.* Low-level viremia persists for at least 7 years in patients on suppressive antiretroviral therapy. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; **105**: 3879–84.
- 31** Delaugerre C, Gallien S, Flandre P *et al.* Impact of low-level-viremia on HIV-1 drug-resistance evolution among antiretroviral treated-patients. *PLoS One* 2012; **7**: e36673.
- 32** Ghosn J, Chaix ML, Peytavin G *et al.* Penetration of enfuvirtide, tenofovir, efavirenz, and protease inhibitors in the genital tract of HIV-1-infected men. *AIDS* 2004; **18**: 1958–61.
- 33** Fourati S, Lambert-Niclot S, Soulie C *et al.* Differential impact of APOBEC3-driven mutagenesis on HIV evolution in diverse anatomical compartments. *AIDS* 2014; **28**: 487–91.



## HIV-1-RNA in seminal plasma correlates with detection of HIV-1-DNA in semen cells, but not with CMV shedding, among MSM on successful antiretroviral regimens

Pierre Gantner<sup>1,2</sup>, Lambert Assoumou<sup>3</sup>, Marianne Leruez-Ville<sup>1,4</sup>, Ludivine David<sup>1</sup>, Marie Suzan-Monti<sup>5-7</sup>, Dominique Costagliola<sup>3</sup>, Christine Rouzioux<sup>1,4</sup> and Jade Ghosn<sup>1,8\*</sup> on behalf of the EVARIST ANRS EP 49 Study Group†

<sup>1</sup>Université Paris Descartes, EA 7327, Université Paris Descartes PRES Sorbonne Paris-Cité, Paris, France; <sup>2</sup>Laboratoire de Virologie, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Strasbourg, France; <sup>3</sup>Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, INSERM, Institut Pierre Louis d'Epidémiologie et de Santé Publique (IPLSEP UMRS 1136), F-75013 Paris, France; <sup>4</sup>APHP, Laboratoire de Virologie, Centre Hospitalier Universitaire Necker-Enfants Malades, Paris, France; <sup>5</sup>INSERM, UMR912 (SESSTIM), 13006 Marseille, France; <sup>6</sup>Aix Marseille Université, UMR\_S912, IRD, 13006 Marseille, France; <sup>7</sup>ORS PACA, Observatoire Régional de la Santé Provence-Alpes-Côte d'Azur, 13006 Marseille, France; <sup>8</sup>APHP, Unité Fonctionnelle de Thérapeutique en Immuno-Infectiologie, Centre Hospitalier Universitaire Hôtel-Dieu, Paris, France

\*Corresponding author. Tel: +33-1-42-34-88-36; Fax: +33-1-42-34-88-52; E-mail: jade.ghosn@aphp.fr  
†Members are listed in the Acknowledgements section.

Received 27 February 2016; returned 22 April 2016; revised 27 April 2016; accepted 2 June 2016

**Objectives:** Intermittent seminal HIV-RNA detection can occur in MSM despite concomitant plasma virological control on combined ART (cART). We undertook the present study to determine if seminal HIV detection was associated with seminal cytomegalovirus (CMV) detection or detection of HIV-infected cells in semen.

**Methods:** Longitudinal semen samples from HIV-1-infected MSM on successful cART enrolled in the EVARIST ANRS EP 49 study were analysed. We first conducted a case–control analysis (ratio 1:3) to assess HIV-DNA detection in semen cells in the 20 patients with detectable HIV-RNA in seminal plasma (cases) matched with 60 participants with undetectable HIV-RNA (controls) based on total HIV-DNA load in blood cells. Second, we measured CMV-DNA in all seminal plasma samples.

**Results:** HIV-1-DNA in semen cells was detected on at least one sample visit in 12/20 cases and 11/60 controls. Detection of HIV-RNA in seminal plasma was associated significantly with the detection of HIV-DNA in semen cells [OR, 7.6 (95% CI, 2.1–28.4);  $P=0.002$ ] when adjusted on total HIV-DNA in blood cells. CMV-DNA was detected in 107/273 seminal plasma samples with a median value of 3.62 log<sub>10</sub> copies/mL (IQR, 2.83–4.38), yielding a prevalence of 39.2%. Seminal CMV-DNA shedding [OR, 1.5 (95% CI, 0.6–3.6);  $P=0.343$ ] was not associated with the risk of detection of HIV-RNA in seminal plasma.

**Conclusions:** The presence of HIV-DNA in semen cells was predictive of HIV-RNA detection, suggesting that viral particles arise through local HIV replication by infected semen cells. Despite virological control, compartmentalization of HIV in the genital tract might act in residual replication and transmission.

### Introduction

Using combined ART (cART) as prevention substantially decreases the risk of sexual HIV transmission.<sup>1,2</sup> Conversely, intermittent seminal HIV-RNA detection can occur in MSM despite concomitant plasma virological control on cART.<sup>3</sup> The burden of the presence of HIV particles in semen can be particularly critical, especially in MSM.<sup>4</sup>

It has been described that this intermittent HIV-1 detection may not be associated with poor drug penetration in the genital tract.<sup>5</sup> In the EVARIST ANRS EP 49 study, HIV-RNA seminal detection was associated with the level of the cellular HIV-DNA reservoir in PBMCs and cannabis use in virologically controlled

HIV-1-infected MSM.<sup>6</sup> In addition, in the CCTG 592 cohort, there was a trend for high-level seminal cytomegalovirus (CMV) shedding to be associated with seminal HIV detection in MSM under efficient cART.<sup>7</sup> Indeed, herpes viruses in the male genital tract influence the recruitment and activation of immune cells in semen and also HIV seminal detection.<sup>8</sup>

However, no study evaluated the link between HIV-infected reservoir cells in semen and seminal detection of HIV, although convincing evidence has emerged from clinical research as well as *in vitro* and animal studies that infected leucocytes indeed play a role in HIV cell-to-cell transmission.<sup>9</sup>

We undertook the present study to determine if seminal HIV detection was associated with seminal CMV detection or

**Table 1.** Predictors of HIV-RNA detection by case–control analysis

|                                      | Cases (N=20), n (%) | Controls (N=60), n (%) | Univariate analysis |       | Multivariable analysis |       |
|--------------------------------------|---------------------|------------------------|---------------------|-------|------------------------|-------|
|                                      |                     |                        | OR (95% CI)         | P     | OR (95% CI)            | P     |
| Detectable HIV-DNA in semen cells    | 12 (60)             | 11 (18)                | 7.9 (2.2–29.1)      | 0.002 | 7.6 (2.1–28.4)         | 0.002 |
| Detectable CMV-DNA in seminal plasma | 9 (45)              | 23 (38)                | 1.2 (0.4–3.5)       | 0.719 | 1.0 (0.3–3.7)          | 0.961 |

detection of HIV-infected cells in semen among participants in the EVARIST ANRS EP 49 study.<sup>6</sup>

## Methods

### Study population

The EVARIST ANRS EP 49 study enrolled 157 HIV-1-infected MSM on successful cART for >6 months. HIV-1-RNA was quantified in seminal plasma and in blood plasma from two paired samples collected 4 weeks apart.<sup>6</sup> The proportion of paired samples with blood plasma viral load <50 copies/mL and detectable viral load in semen was 7.6%. These dissociations corresponded to 20 patients, of whom 18 had HIV-RNA detected in semen at day 0 or 28 and 2 had HIV-RNA detected in both semen samples. The median value of HIV-RNA in seminal plasma was 145 copies/mL (range, 100–1450). A high level of total HIV-DNA in PBMCs was the major predictor of HIV-RNA detection in semen.<sup>6</sup>

For the present substudy, we first conducted a case–control analysis (ratio 1:3) to assess HIV-DNA detection in semen cells in the 20 patients with detectable HIV-RNA in seminal plasma (cases) matched with 60 patients with undetectable HIV-RNA (controls) based on total HIV-DNA load in blood cells ( $\log_{10}$  mean of the two measurements  $\pm 0.3 \log_{10}$  copies/ $10^6$  PBMCs). Second, we measured CMV-DNA in all seminal plasma samples.

### Ethics

The Ethics Committee of Bicêtre Hospital approved the study protocol and all participating patients provided written informed consent.

### DNA extraction from semen cells and total HIV-DNA quantification

We analysed frozen pelleted semen cells from 80 patients (160 samples). Total DNA was extracted using a QIAmp DNA Micro Kit (Qiagen, Courtaboeuf, France), with a final elution volume of 35  $\mu$ L. Total DNA in the extracts was quantified using Nanodrop (Labtech, Ringmer, UK). Cell-associated HIV-DNA was qualitatively assessed in duplicate by a real-time PCR assay with the Generic HIV DNA CELL assay (Biocentric, Bandol, France) as described previously.<sup>10</sup> DNA loading was controlled by concurrently amplifying the albumin gene by real-time PCR and quantifying with reference to a control human genomic DNA (Roche, Meylan, France).

### DNA extraction from seminal plasma and CMV-DNA quantification

Viral DNA was extracted from 200  $\mu$ L of seminal plasma using the DNA Isolation Kit III on the MagNA Pure LC system (Roche, Meylan, France) per the manufacturer's protocol, with a final elution volume of 100  $\mu$ L. Levels of CMV in seminal plasma were measured by in-house real-time PCR as described previously.<sup>11</sup>

### Statistical considerations

A conditional logistic regression model was used to assess the link between detectable HIV-DNA in semen cells and HIV-RNA in seminal plasma, further adjusted on CMV-DNA shedding in seminal plasma. The relationship between HIV-RNA plasma/semen dissociations and seminal CMV shedding was assessed using a generalized estimating equation (GEE) logistic regression. Variables are given as frequency (%), median (range), median (IQR) and OR (95% CI).

## Results

### HIV-DNA detection in semen cells and HIV-RNA detection in seminal plasma

In a case–control subanalysis, 20 cases with detectable HIV-RNA in seminal plasma were matched with 60 controls based on total HIV-DNA load in blood cells. Based on Nanodrop DNA quantification of cell extracts, a median of 76540 cells/20  $\mu$ L (range, 30790–291900) was used to perform HIV-DNA measurements (in duplicate). All 160 semen cell samples were tested for total HIV-DNA, which was detected in 25 (16%) samples [median, 21 copies/ $10^6$  semen cells (range, 1–145)]. HIV-1-DNA in semen cells was detected on at least one sample visit in 12/20 cases and 11/60 controls. For cases (totalling 40 semen samples), concomitant detection of HIV-DNA and HIV-RNA was observed in 5 of the 22 semen samples with detectable HIV-RNA. HIV-1-DNA only was detected in 7 of the 18 semen samples negative for HIV-RNA. Detection of HIV-RNA in seminal plasma was significantly associated with the detection of HIV-DNA in semen cells [OR, 7.6 (95% CI, 2.1–28.4);  $P=0.002$ ] when adjusted on total HIV-DNA in blood cells (Table 1).

### Seminal CMV-DNA shedding among MSM on cART

The quantification of CMV-DNA in seminal plasma was possible in 273 samples, since 39 samples were used for the previous analysis (no CMV data could be obtained for both semen samples for only four patients). CMV-DNA was detected in 107/273 seminal plasma samples with a median value of 3.62  $\log_{10}$  copies/mL (IQR, 2.83–4.38), yielding a prevalence of 39.2%. In GEE logistic regression, seminal CMV-DNA shedding [OR, 1.5 (95% CI, 0.6–3.6);  $P=0.343$ ] was not associated with the risk of detection of HIV-RNA in seminal plasma. Further, high-level CMV shedding in semen (e.g. >4  $\log_{10}$  copies/mL) was not associated with HIV-RNA detection [OR, 1.3 (95% CI, 0.4–4.2);  $P=0.672$ ].

## Discussion

Intermittent HIV replication in semen of MSM under suppressive cART poses a significant challenge, underlying a residual risk of sexual transmission. Moreover, predictors of HIV particle

detection in semen remain elusive, even though they could guide effective therapeutic intervention. Using semen samples of patients enrolled in the EVARIST ANRS EP 49 study, we showed that HIV-DNA was not only detectable in semen cells of patients with detectable HIV-RNA in seminal plasma, but also in patients with undetectable seminal HIV-RNA. These infected cells could play a role in mucosal transmission of HIV, as shown in a simian immunodeficiency virus (SIV)/macaque model where infected semen leucocytes were able to produce infective SIV viral particles.<sup>12</sup> Although we cannot ensure that HIV-infected cells were productive, the presence of HIV reservoir cells in semen could participate in residual transmission even under suppressive cART.

Interestingly, the presence of HIV-DNA in semen cells was predictive of HIV-RNA detection, suggesting that viral particles arise through local HIV replication by infected semen cells. Our findings are consistent with a compartmentalization of HIV in the genital tract.<sup>13,14</sup> Besides, the inconsistent detection of HIV-DNA in semen cells is in agreement with intrapatent dynamics of HIV genital reservoirs under suppressive cART.

We found similar rates of CMV shedding and viral loads in semen as other studies [i.e. CMV detection in the CCTG 592 cohort: frequency 49.1%, median detectable viral load of  $4.3 \log_{10}$  copies/mL (IQR, 3.2–4.9)].<sup>7</sup> Such high rates of CMV shedding, which can also be sexually transmitted, are surprising with regard to the median CD4 cell counts of  $\sim 600/\text{mm}^3$  in both studies. Unlike the CCTG 592 cohort,<sup>7</sup> we found no relationship between CMV-DNA and HIV-RNA in the semen of MSM enrolled in the EVARIST ANRS EP 49 study. This may be due to the cross-sectional design of the cohort, whereas two semen samples were longitudinally collected in the EVARIST ANRS EP 49 study. Further, detection of both HIV-DNA and HIV-RNA was intermittent in our study, which may account for differences between the two studies. Interestingly, in the CCTG 592 cohort, CMV shedding was associated with high HIV-1-DNA levels in blood,<sup>15</sup> which is consistent with the association between HIV-RNA in semen and high HIV-DNA blood reservoir levels in the EVARIST ANRS EP 49 study.<sup>6</sup>

In conclusion, we showed that the detection of HIV viral particles was associated with the presence of HIV reservoir cells in semen of MSM under suppressive cART, but HIV-RNA detection was not associated with seminal CMV shedding. The latter finding suggested different mechanisms of viral persistence in this compartment for these two infections. We demonstrated that despite virological control, HIV anatomical reservoirs might play a role in HIV local residual replication and sexual transmission, although epidemiological evidence points against HIV residual transmission on successful cART.<sup>2,16</sup> Further studies should focus on targeting archived virus in the genital tract and evaluate residual transmission risk due to infected leucocytes in semen.

## Acknowledgements

We thank all the patients and staff of the HIV clinical centres who participated in the study.

## Members of the EVARIST ANRS EP 49 Study Group

Jade Ghosn, Marie Suzan-Monti, Dominique Costagliola, Marianne Leruez-Ville, Christine Rouzioux, Bruno Spire, Jean-Marc Tréluyer, Laurence Mascard, Roland Landman, David Zucman, Diane Ponscarne, Agathe

Rami, Pierre Sellier, Jean-Paul Viard, Aurore Delobelle, Céline Beaudoux, Georges Point, Lucie Marchand and Sandrine Couffin-Cadiergues.

## Funding

This study was funded by the French National Agency for Research on AIDS and Viral Hepatitis (ANRS).

## Transparency declarations

D. C. has received travel grants, consultancy fees, honoraria and study grants from various pharmaceutical companies including Abbott, Boehringer Ingelheim, Bristol-Myers Squibb, Gilead Sciences, GlaxoSmithKline, Janssen, Merck Sharp & Dohme-Chibret, Roche and Viiv Healthcare. J. G. has received travel grants, honoraria and study grants from various pharmaceutical companies including Bristol-Myers Squibb, Gilead Sciences, Merck Sharp & Dohme-Chibret, Roche and Viiv Healthcare. All other authors: none to declare.

## References

- Cohen MS, Chen YQ, McCauley M *et al.* Prevention of HIV-1 infection with early antiretroviral therapy. *N Engl J Med* 2011; **365**: 493–505.
- Grinsztejn B, Hosseinipour MC, Ribaudo HJ *et al.* Effects of early versus delayed initiation of antiretroviral treatment on clinical outcomes of HIV-1 infection: results from the phase 3 HPTN 052 randomised controlled trial. *Lancet Infect Dis* 2014; **14**: 281–90.
- Lambert-Niclot S, Tubiana R, Beaudoux C *et al.* Detection of HIV-1 RNA in seminal plasma samples from treated patients with undetectable HIV-1 RNA in blood plasma on a 2002–2011 survey. *AIDS* 2012; **26**: 971–5.
- Boggaley RF, White RG, Boily MC. HIV transmission risk through anal intercourse: systematic review, meta-analysis and implications for HIV prevention. *Int J Epidemiol* 2010; **39**: 1048–63.
- Matusali G, Dereuddre-Bosquet N, Le Tortorec A *et al.* Detection of simian immunodeficiency virus in semen, urethra, and male reproductive organs during efficient highly active antiretroviral therapy. *J Viral* 2015; **89**: 5772–87.
- Ghosn J, Leruez-Ville M, Blanche J *et al.* HIV-1 DNA levels in peripheral blood mononuclear cells and cannabis use are associated with intermittent HIV shedding in semen of men who have sex with men on successful antiretroviral regimens. *Clin Infect Dis* 2014; **58**: 1763–70.
- Gianella S, Smith DM, Vargas MV *et al.* Shedding of HIV and human herpesviruses in the semen of effectively treated HIV-1-infected men who have sex with men. *Clin Infect Dis* 2013; **57**: 441–7.
- Galvin SR, Cohen MS. The role of sexually transmitted diseases in HIV transmission. *Nat Rev Microbiol* 2004; **2**: 33–42.
- Anderson DJ, Politch JA, Nadolski AM *et al.* Targeting Trojan Horse leukocytes for HIV prevention. *AIDS* 2010; **24**: 163–87.
- Avettand-Fenoel V, Chaix ML, Blanche S *et al.* LTR real-time PCR for HIV-1 DNA quantitation in blood cells for early diagnosis in infants born to seropositive mothers treated in HAART area (ANRS CO 01). *J Med Virol* 2009; **81**: 217–23.
- Leruez-Ville M, Ouachée M, Delarue R *et al.* Monitoring cytomegalovirus infection in adult and pediatric bone marrow transplant recipients by a real-time PCR assay performed with blood plasma. *J Clin Microbiol* 2003; **41**: 2040–6.
- Bernard-Stoecklin S, Gommel C, Corneau AB *et al.* Semen CD4+ T cells and macrophages are productively infected at all stages of SIV infection in macaques. *PLoS Pathog* 2013; **9**: e1003810.

**13** Anderson JA, Ping LH, Dibben O *et al.* HIV-1 populations in semen arise through multiple mechanisms. *PLoS Pathog* 2010; **6**: e1001053.

**14** Ghosn J, Viard JP, Katlama C *et al.* Evidence of genotypic resistance diversity of archived and circulating viral strains in blood and semen of pre-treated HIV-infected men. *AIDS* 2004; **18**: 447–57.

**15** Gianella S, Massanella M, Richman DD *et al.* Cytomegalovirus replication in semen is associated with higher levels of proviral HIV DNA and

CD4+ T cell activation during antiretroviral treatment. *J Virol* 2014; **88**: 7818–27.

**16** Rodger A, Bruun T, Cambiano V *et al.* HIV transmission risk through condomless sex if HIV+ partner on suppressive ART: PARTNER Study. In: *Abstracts of the Twenty-first Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections, Boston, MA, 2014*. Abstract 153LB. Foundation for Retrovirology and Human Health, Alexandria, VA, USA.

RESEARCH ARTICLE

# Switch to Ritonavir-Boosted versus Unboosted Atazanavir plus Raltegravir Dual-Drug Therapy Leads to Similar Efficacy and Safety Outcomes in Clinical Practice

Pierre Gantner<sup>1\*</sup>, Firouze Bani-Sadr<sup>2</sup>, Rodolphe Garraffo<sup>3</sup>, Pierre-Marie Roger<sup>4</sup>, Michèle Treger<sup>5</sup>, Thomas Jovelin<sup>6</sup>, Pascal Pugliese<sup>4</sup>, David Rey<sup>1</sup>, Dat'AIDS cohort<sup>¶</sup>

**1** Le Trait d'Union, HIV-infection care center, Nouvel Hôpital Civil, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Strasbourg, France, **2** Unité des Maladies Infectieuses et Tropicales, Hôpital Robert Debré, Centre Hospitalier Universitaire de Reims, Reims, France, **3** Pharmacologie clinique, Pasteur University Hospital, Nice, France, **4** Infectiologie, Centre Hospitalier Universitaire de Nice, Nice, France, **5** Laboratoire de Biostatistiques, Faculté de Médecine, Strasbourg, France, **6** Service d'Infectiologie, Service des Maladies Infectieuses et Tropicales, Hôtel-Dieu, Centre Hospitalier Universitaire de Nantes, Nantes, France



CrossMark  
click for updates

¶ Members are listed in the Acknowledgments section.

\* pierre.gantner@chru-strasbourg.fr

**OPEN ACCESS**

**Citation:** Gantner P, Bani-Sadr F, Garraffo R, Roger P-M, Treger M, Jovelin T, et al. (2016) Switch to Ritonavir-Boosted versus Unboosted Atazanavir plus Raltegravir Dual-Drug Therapy Leads to Similar Efficacy and Safety Outcomes in Clinical Practice. PLoS ONE 11(10): e0164240. doi:10.1371/journal.pone.0164240

**Editor:** Paula B. Andrade, Universidade do Porto, Faculdade de Farmácia, PORTUGAL

**Received:** June 22, 2016

**Accepted:** September 21, 2016

**Published:** October 31, 2016

**Copyright:** © 2016 Gantner et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Data Availability Statement:** All relevant data are within the paper.

**Funding:** The authors received no specific funding for this work.

**Competing Interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

## Abstract

### Objectives

To assess immunovirological response, safety and pharmacokinetic of NRTI-sparing regimen dual therapy of atazanavir (ATV) and raltegravir (RAL) in maintenance strategy.

### Methods

A retrospective analysis was conducted on a cohort of HIV-infected adults followed in French centers (Dat'AIDS cohort), comparing the proportions of virological and therapeutic failures between ATV + RAL and ATV/ritonavir + RAL dual therapy regimens.

### Results

283 patients were assessed: 185 switched for ATV + RAL and 98 for ATV/ritonavir + RAL dual therapy. Virological failure rate at week 96 was 13.8% (95% CI, 9.8–17.8), without difference between the two groups (Log-rank Test,  $p = 0.87$ ). The cumulative percentages of patients remaining free of therapeutic failure at week 24, 48 and 96 of dual therapy were 74.9% (95% CI, 69.9–80.0), 65.4% (95% CI, 59.8–70.9) and 53.4% (95% CI, 47.5–59.2), respectively. Four out of 39 confirmed virological failures developed RAL resistance. By multivariate analysis, virological failure was associated with high HIV-1 RNA zenith ( $p = 0.02$ ), low CD4+ T-cell count at baseline ( $p < 0.001$ ) and short duration on antiretroviral therapy ( $p < 0.001$ ). Before week 96, dual therapy was discontinued in 44 patients (16%) because of various adverse events, with no difference between the two groups. Minimal

plasma levels were targeted in 84% and 87% of patients for ATV and RAL, respectively, and both were significantly higher in ritonavir-boosted regimen.

## Conclusions

Emerging RAL-resistance and discontinuations for adverse events resulted in moderate efficacy rates of ATV and RAL dual therapy in heavily pretreated patients.

## Introduction

HIV-1 antiretroviral therapy (ART) is a life-long treatment. While virological success is achieved in most patients [1], ART often needs to be modified due to adverse events or to prevent long-term toxicity. Although, these long-term complications, have been related to other factors than ART toxicity [2,3] such as a higher prevalence of traditional risk factors [4,5] and HIV replication [6], preventing drug-related toxicity should be considered for ART switch.

To decrease drug burden, reducing from standard ART to a two or one drug-containing regimen has been evaluated, with conflicting results on virological efficacy [7,8]. Indeed, switching to maraviroc and raltegravir dual therapy was too “weak” to maintain virological success [7], with a high risk of emerging resistance. Besides, no predictors of virological failure were identified [9]. Conversely, darunavir/ritonavir or lopinavir/ritonavir monotherapy exhibited efficacy rate concordant with triple drug regimen [10,11], with no selection of major resistant variants at failure [12]. However, due to insufficient diffusion in cerebro-spinal fluid of the boosted protease inhibitor, a sanctuary replication in central nervous system was noticed [13].

In these studies, a shorter time on ART before monotherapy, which was consistent with a high HIV reservoir, was predictive of virological failure [14]. Yet, NRTI-sparing regimens remain an interesting but under-evaluated option for drug-reducing strategies. Dual therapy including raltegravir (RAL), an integrase inhibitor, and atazanavir, a protease inhibitor, (with or without ritonavir booster, ATV or ATV/r) is such an option. A single randomized trial with naïve patients starting ATV and RAL dual therapy was discontinued because of high rates of emerging RAL resistance [15], whereas pilot studies in maintenance strategies showed short-term efficacy [16–19]. These studies were conducted on small groups of patients, mostly evaluating ritonavir-boosted strategies, with no assessment of lipid profiles. Besides, some of these studies reported grade 3 or 4 total bilirubin abnormalities [15,16] that were maybe associated with the ATV dosing strategies.

Besides, RAL or ATV-containing regimen may have a favorable impact on immune activation [20–25]. Although controversial, it seems that both RAL and ATV (especially unboosted)-based regimen show improvements in lipid profiles [26–29]. Thus, switching to a combination including RAL and ATV in ART-experienced patients is an ongoing studied option [30].

In the present study, we aimed to assess viral suppression of ART-experienced patients switching to dual therapy on a large cohort of patients, allowing comparison between boosted and unboosted-ATV regimen. As secondary outcomes, we assessed safety, drug plasma trough concentrations and predictors of virological failures and dual therapy discontinuations.

## Methods

### Study design

The Dat'AIDS cohort represents a collaboration of major French HIV treatment centers. These centers maintain prospective cohorts of all HIV-1-infected patients who provided written consent. The cohorts are implemented via a common electronic medical record [31]. Past and prospective clinical events, laboratory tests and therapeutic history are routinely gathered with appropriate dates. All participants gave prospective written consent for their clinical data to be anonymized and then analyzed for research purposes (Commission Nationale de l'Informatique et des Libertés). The local Ethics Committee of the Medicine Faculty, Strasbourg, France, approved the study.

We performed a retrospective longitudinal analysis on HIV-1-positive adults participating to the Dat'AIDS cohort who were ART-experienced and were switched to ATV+RAL or ATV/r+RAL regimen between January 2008 and June 2014, whatever baseline CD4+ T-cell count or HIV-1 RNA. Comparing the efficacy, measured by the proportion of therapeutic and virological success at week 24, 48 and 96, between the two regimens was assessed as the primary outcome measure. Confirmed virological failure was defined as a plasma HIV-1 RNA > 50 copies/mL based on two consecutive measurements within a month or HIV-1 RNA > 1000 copies/mL on one sample. Therapeutic failure was defined by dual therapy discontinuation whatever the reason or confirmed virological failure. Secondary objectives were predictors of virological and therapeutic failure, safety and drug plasma levels assessment through follow-up.

### Data collection

Demographic data, HIV disease status, previous ART, reason for changing therapy, steady-state plasma levels of RAL and ATV, laboratory parameters; in particular plasma HIV-1 RNA, CD4+ and CD8+ T-cell count, total bilirubin, alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), serum creatine phosphokinase (CPK), lipids, creatinine and estimated glomerular filtration rate (eGFR) was obtained using the MDRD formula were extracted from recorded medical charts. Laboratory abnormalities were graded using the 2003 ANRS scale (<http://www.anrs.fr>). Genotypic resistance testing was performed at virological failure and was interpreted according to the 2015 ANRS algorithm (<http://www.hivfrenchresistance.org>) according to the current French guidelines [32].

### Statistical considerations

Dual therapy efficacy was analyzed according to the time to loss of therapeutic and virological response (TLOVR) algorithm. The TLOVR was estimated using the Kaplan-Meier method.

The Student's *t*-test was used to compare any changes in quantitative variables. Categorical variables were compared using the  $\chi^2$  test or Fisher's exact. All tests were two-tailed and performed with a level of statistical significance of 0.05. Between-strategy mean difference in trough concentrations was evaluated by calculating the geometric mean ratio (GMR) with a 90% confidence interval (CI).

Predictors of *virological and therapeutic failure, with a special attention to therapeutic failure for adverse events* were assessed. Factors considered were plasma viral load (plasma HIV RNA < 50 HIV-1 RNA copies/mL versus > 50 copies/mL), history of virological failure (yes and no), age, gender, risk behaviour for HIV transmission, CDC stage, current CD4 count, CD4 nadir, viral load zenith, delay since HIV infection diagnosis, duration with HIV-1 RNA < 50 copies/mL on ART status, previous ART regimen, reason for switching and boosted or not dual therapy. Predictors of *virological and therapeutic failure* were also assessed in a focus

on patients with HIV-1 RNA <50 copies/mL at baseline. The differences between groups in characteristics at baseline were evaluated using non-parametric tests (Wilcoxon and Fisher's exact tests). Variables achieving a  $p$  value <0.17 were entered into a multivariate logistic regression model with a backward stepwise method based on the likelihood ratio test. Adjusted odds ratios (aOR) are given with a 95% CI. Statistical analyses were performed with R software (R Foundation, Vienna, Austria).

Data are presented as number (percentage) or median (interquartile range 25–75% [IQR]).

## Results

### Participant Disposition

A total of 283 patients were analyzed: 185 switched for ATV+RAL and 98 switched ATV/r+RAL dual therapy; characteristics are depicted in [Table 1](#). Patients were followed for a median of 95 weeks (IQR, 24–185). One hundred twenty-seven patients (45%) had past history of confirmed virological failure. At baseline, 80% of patients had HIV-1 RNA <50 copies/mL and the remaining 20% had a median plasma HIV-1 RNA of 663 copies/mL (IQR, 159–37095), median CD4+ T-cell count was 552/mm<sup>3</sup> (IQR, 391–717). Before switching to dual therapy, 56% and 20% of patients were already on an ATV and RAL-based regimen, respectively. The main reason of switching to dual therapy was for ART-related adverse events (47%). On dual therapy, patients received primarily ATV 200 mg BID (42%) and 400 mg QD (21%).

### Virological response

The cumulative percentages of patients remaining free of confirmed virological failure on dual therapy were 93.3% (95% CI, 90.4–96.2) at week 24, 89.4% (95% CI, 85.8–93) at week 48 and 86.2% (95% CI, 82.2–90.2) at week 96, without difference between ritonavir-boosted and unboosted strategies ([Fig 1A](#)). Before week 96, confirmed virological failure occurred in 39 patients (14%) [26 (14%) in the ATV+RAL group; 13 (13%) in the ATV/r+RAL group] with HIV-1 RNA ranging from 62 to 100000 copies/mL. In the multivariate analysis ([Table 2](#)), the risk of virological failure was strongly associated with a high historical HIV-1 RNA zenith (aOR per log copies/mL, 1.74 [1.02–2.98];  $p = 0.02$ ), a low CD4+ T-cell count at baseline (aOR per 100/mm<sup>3</sup>, 0.72 [0.65–0.89];  $p < 0.001$ ) and a short duration on ART (aOR per year since ART initiation, 0.90 [0.84–0.96];  $p < 0.001$ ). A past history of virological failure and a detectable HIV-1 RNA at baseline were not associated with an increased risk of virological failure on dual therapy. When focusing on patients with HIV-1 RNA < 50 copies/mL at baseline ( $n = 227$ ), predictors of virological failure were similar to the entire cohort.

Both past and at failure genotypic resistance testing was available in 31/39 participants with confirmed virological failure, no resistance to RAL and ATV were detected before switching. Four out of 31 confirmed virological failures with available genotypes developed RAL resistance: two of them had emerging Y143C (week 24 and week 48), one patient had N155H (week 48) and the last patient had Q148R (week 48). Neither ATV nor other RAL resistance mutations were observed.

### Therapeutic response

The cumulative percentages of patients remaining free of therapeutic failure at week 24, 48 and 96 of dual therapy were 74.9% (95% CI, 69.9–80.0), 65.4% (95% CI, 59.8–70.9) and 53.4% (95% CI, 47.5–59.2), respectively ([Fig 1B](#)). By multivariate analysis ([Table 2](#)), therapeutic failure was associated with a low CD4+/CD8+ T-cell ratio at baseline (aOR per ratio unit, 0.38 [0.14–0.97];  $p = 0.02$ ), C CDC stage (aOR, 1.84 [0.99–3.45];  $p = 0.05$ ) and a short duration on ART (aOR

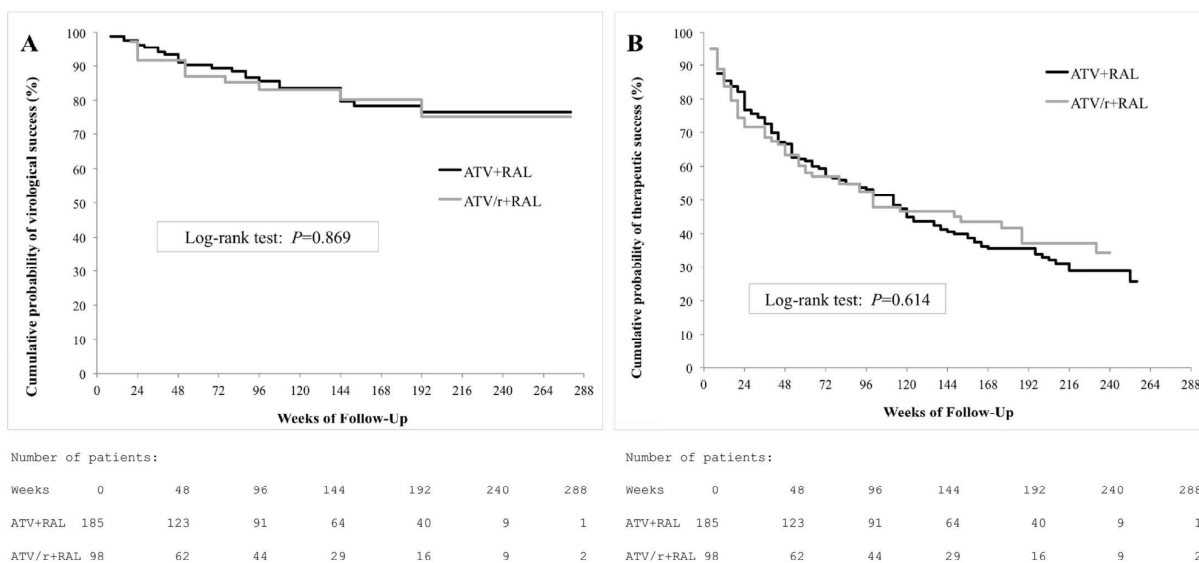


**Table 1. Patients' characteristics at baseline.**

| Characteristic   | Overall (n = 283) | ATV+RAL (n = 185) | ATV/r+RAL (n = 98) | p value |
|--|-------------------|-------------------|--------------------|---------|
| Male gender, n (%)   | 173 (61%)         | 106 (57%)         | 67 (68%)           | 0.07    |
| Age, years, median (IQR)   | 53 (48–62)        | 52 (47–60)        | 56.5 (49–66)       | 0.01    |
| Time since HIV diagnosis, years, median (IQR)                    | 16 (10–20)        | 15 (9–19)         | 17 (12–20)         | 0.03    |
| Time on antiretroviral therapy, years, median (IQR)              | 12 (7–15)         | 12 (7–14)         | 13 (9–15)          | 0.03    |
| History of AIDS defining events, n (%)                           | 91 (32%)          | 54 (29%)          | 37 (38%)           | 0.1     |
| Co-infection with HCV, n (%)                                     | 30 (11%)          | 18 (10%)          | 12 (12%)           | 0.5     |
| Co-infection with HBV, n (%)                                     | 5 (2%)            | 4 (2%)            | 1 (1%)             | 0.7     |
| Baseline HIV-1 RNA <50 copies/mL, n (%)                          | 227 (80%)         | 150 (81%)         | 77 (79%)           | 0.6     |
| Time with HIV-1 RNA <50 copies/mL, years, median (IQR)           | 9 (7–14)          | 9 (5–14)          | 10 (8–13)          | 0.1     |
| Zenith HIV-1 RNA, log copies/mL, median (IQR)                    | 4.98 (4.45–5.48)  | 4.88 (4.31–5.45)  | 5.13 (4.58–5.59)   | 0.04    |
| Baseline CD4+ T-cell count, cells/mm <sup>3</sup> , median (IQR) | 552 (391–717)     | 527 (388–713)     | 593 (398–726)      | 0.3     |
| Nadir CD4+ T-cell count, cells/mm <sup>3</sup> , median (IQR)    | 172 (72–254)      | 191 (72–262)      | 149 (54–243)       | 0.1     |
| Baseline CD4+/CD8+ T-cell ratio, median (IQR)                    | 0.63 (0.42–0.82)  | 0.64 (0.42–0.83)  | 0.62 (0.42–0.81)   | 0.5     |
| Total bilirubin, μmol/L, median (IQR)                            | 16 (9–34)         | 16 (8–32)         | 20 (9–36)          | 0.8     |
| ALT, IU/L, median (IQR)  | 26 (18–42)        | 22 (18–37)        | 29 (20–52)         | 0.04    |
| AST, IU/L, median (IQR)  | 28 (22–39)        | 26 (21–34)        | 32 (24–47)         | 0.002   |
| CK, IU/L, median (IQR)   | 110 (78–219)      | 105 (78–188)      | 150 (81–234)       | 0.06    |
| Creatinine, μmol/L, median (IQR)                                 | 76 (64–99)        | 74 (61–97)        | 80 (69–99)         | 0.6     |
| eGFR, mL/min, median (IQR)                                       | 83 (64–102)       | 83 (62–103)       | 83 (65–99)         | 0.8     |
| Lipid profile, mmol/L, median (IQR)                              |                   |                   |                    |         |
| Total cholesterol  | 5.33 (4.40–6.16)  | 5.24 (4.18–6.10)  | 5.43 (4.63–6.18)   | 0.5     |
| HDL  | 2.96 (2.05–3.60)  | 2.96 (2.19–3.75)  | 2.98 (2.01–3.52)   | 0.5     |
| LDL  | 1.16 (0.78–1.52)  | 1.16 (0.75–1.50)  | 1.17 (0.89–1.68)   | 0.2     |
| Triglycerides  | 1.69 (1.10–1.55)  | 1.68 (1.10–2.57)  | 1.69 (1.17–2.53)   | 0.8     |
| Previous antiretroviral regimen, n (%)                           |                   |                   |                    | 0.1     |
| 2 NRTI + 1 PI±r  | 128 (45%)         | 75 (41%)          | 53 (54%)           |         |
| 2 PI±r   | 28 (10%)          | 15 (8%)           | 13 (13%)           |         |
| 2 NRTI + 1 NNRTI   | 24 (9%)           | 18 (10%)          | 6 (6%)             |         |
| 1 PI±r + 1 INI   | 24 (9%)           | 19 (10%)          | 5 (5%)             |         |
| 2 NRTI + 1 INI   | 21 (7%)           | 15 (8%)           | 6 (6%)             |         |
| 1 NRTI + 1 PI±r  | 12 (4%)           | 6 (3%)            | 6 (6%)             |         |
| 3 NRTI   | 11 (4%)           | 10 (5%)           | 1 (1%)             |         |
| Others   | 35 (12%)          | 27 (15%)          | 8 (8%)             |         |
| Number of previous antiretroviral regimen, median (IQR)          | 7 (4–11)          | 6 (4–11)          | 8 (5–11)           | 0.02    |
| Reasons for switching to dual therapy, n (%)                     |                   |                   |                    | 0.2     |
| Adverse events   | 134 (47%)         | 80 (43%)          | 54 (55%)           |         |
| End of treatment/protocol  | 31 (11%)          | 26 (14%)          | 5 (5%)             |         |
| Virological failure  | 27 (10%)          | 17 (9%)           | 10 (10%)           |         |
| Preventing toxicity  | 17 (6%)           | 13 (7%)           | 4 (4%)             |         |
| Simplification   | 15 (5%)           | 9 (5%)            | 6 (6%)             |         |
| Patients' personal decision                                      | 11 (4%)           | 8 (4%)            | 3 (3%)             |         |
| Pharmacological adjustment                                       | 10 (4%)           | 5 (3%)            | 5 (5%)             |         |
| Other reasons  | 38 (13%)          | 27 (15%)          | 11 (11%)           |         |

ATV or ATV/r: Atazanavir or Ritonavir-boosted Atazanavir; HDL: High-density lipoprotein; IQR: Interquartile Range; LDL: Low-density lipoprotein; NNRTI: Non-Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitor; NRTI: Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitor; PI±r: Protease Inhibitor ± ritonavir; RAL: Raltegravir.

doi:10.1371/journal.pone.0164240.t001



**Fig 1. Cumulative probability of treatment success according with ritonavir association.** Survival curves by time to loss of virological response analysis, according to virological failure (A) and treatment failure (B). ATV/r or ATV: Boosted or Unboosted Atazanavir, RAL: Raltegravir.

doi:10.1371/journal.pone.0164240.g001

per year since ART initiation, 0.95 [0.90–0.99];  $p = 0.03$ ). There was no difference between ritonavir-boosted and unboosted strategies. Before week 96, 132 (46.6%) patients stopped dual therapy (Table 3), partly because of various adverse events attributed to the new regimen ( $n = 44$ ). These were renal toxicity ( $n = 8$ ), gastrointestinal disturbances ( $n = 5$ ), cutaneous effects ( $n = 5$ ), hyperbilirubinemia ( $n = 4$ ), neuropsychiatric side effects ( $n = 4$ ), dyslipidemia

**Table 2. Significant predictors associated with virological failure and therapeutic failure.**

|   | Virological failure (n = 283) |               | Univariate analysis (p) | Multivariate analysis (p) | OR (95% CI)                   |
|---|-------------------------------|---------------|-------------------------|---------------------------|-------------------------------|
|   | Yes (n = 39)                  | No (n = 244)  |                         |                           |                               |
| Median historical HIV-1 RNA zenith, log copies/mL (IQR) | 5.2 (5.0–5.7)                 | 4.9 (4.3–5.4) | <0.001                  | 0.02                      | 1.74 <sup>a</sup> (1.02–2.98) |
| Median CD4+ T-cell count, /mm <sup>3</sup> (IQR)        | 429 (241–571)                 | 572 (402–728) | 0.002                   | <0.001                    | 0.72 <sup>b</sup> (0.65–0.89) |
| Median duration on ART, year (IQR)                      | 10 (4–13)                     | 12 (8–15)     | 0.01                    | <0.001                    | 0.90 <sup>c</sup> (0.84–0.96) |
|   | Therapeutic failure (n = 283) |               | Univariate analysis (p) | Multivariate analysis (p) | OR (95% CI)                   |
|   | Yes (n = 132)                 | No (n = 151)  |                         |                           |                               |
| Median CD4+/CD8+ T-cell ratio (IQR)                     | 0.6 (0.4–0.8)                 | 0.7 (0.5–0.9) | 0.02                    | 0.02                      | 0.38 <sup>d</sup> (0.14–0.97) |
| C CDC stage, n (%)                                      | 51 (39%)                      | 40 (26%)      | 0.02                    | 0.05                      | 1.84 (0.99–3.45)              |
| Median duration on ART, year (IQR)                      | 12 (7–14)                     | 12 (8–15)     | 0.04                    | 0.03                      | 0.95 <sup>c</sup> (0.90–0.99) |

CI, Confidence Interval; IQR, Interquartile Range; OR, Odd-Ratio.

<sup>a</sup>, per log copies/mL;

<sup>b</sup>, per 100/mm<sup>3</sup>;

<sup>c</sup>, per year;

<sup>d</sup>, per ratio unit.

doi:10.1371/journal.pone.0164240.t002

**Table 3. Reasons for stopping dual therapy before week 96 (n = 132).**

|  | Overall (n = 132) | ATV+RAL (n = 86) | ATV/r+RAL (n = 46) | p value |
|--|-------------------|------------------|--------------------|---------|
| Reasons for stopping dual therapy, n (%) |                   |                  |                    | 0.522   |
| Adverse events                           | 44 (33%)          | 24 (28%)         | 20 (44%)           |         |
| Virological failure                      | 39 (30%)          | 26 (30%)         | 13 (28%)           |         |
| With emerging RAL resistance             | 4                 | 3                | 1                  |         |
| With emerging ATV resistance             | 0                 | 0                | 0                  |         |
| Patients' personal decision              | 13 (10%)          | 10 (12%)         | 3 (7%)             |         |
| Pharmacological adjustment               | 6 (5%)            | 4 (5%)           | 2 (4%)             |         |
| Pregnancy project or current             | 3 (2%)            | 2 (2%)           | 1 (2%)             |         |
| Other reasons                            | 27 (20%)          | 20 (23%)         | 7 (15%)            |         |

ATV or ATV/r: Atazanavir or Ritonavir-boosted Atazanavir; RAL: Raltegravir.

doi:10.1371/journal.pone.0164240.t003

(n = 3), liver toxicity (n = 3), mitochondrial toxicity (n = 3) and others (n = 9). The multivariate analysis identified that a high number of previous ART regimen was a significant predictor of stopping dual therapy due to adverse event (aOR per previous ART regimen, 1.07 [1.00–1.14]; p = 0.03).

### Laboratory outcomes

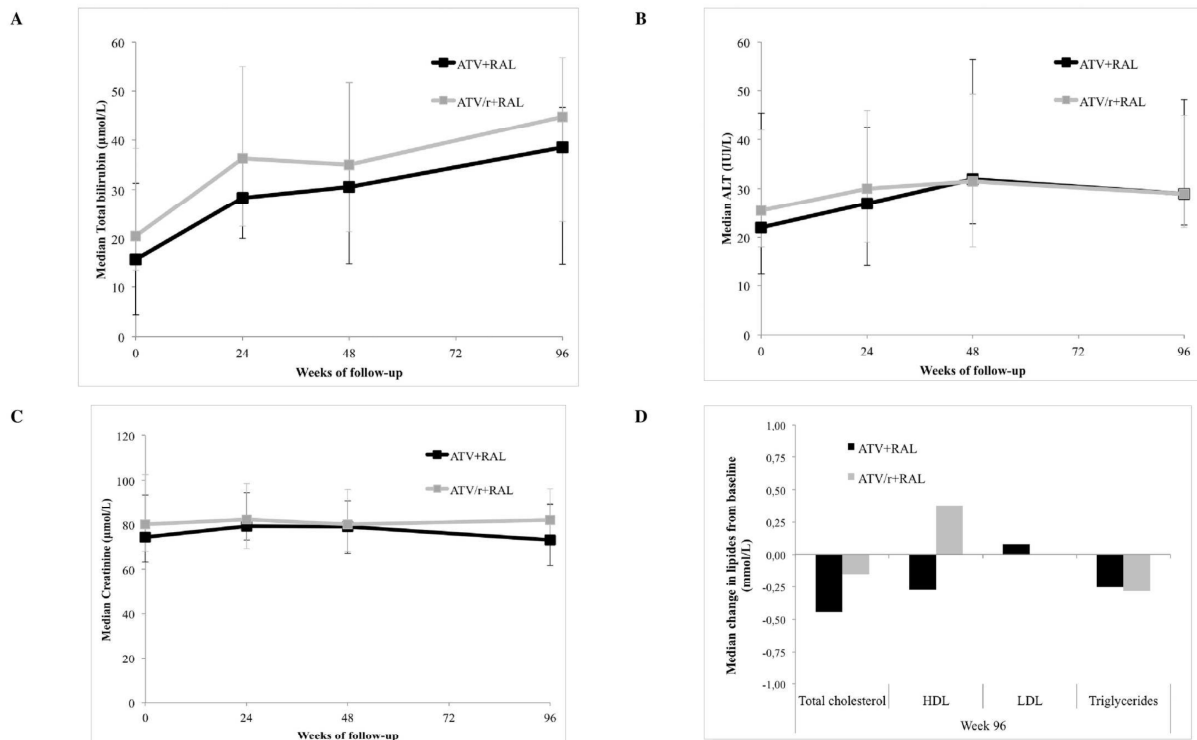
The CD4+ T-cell count increased, with a mean increase at week 96 of 60 cells/mm<sup>3</sup> (95% CI, 19–100, p = 0.005). Similarly, the CD4+/CD8+ T-cell increased on study, with a mean increase at week 96 of 0.21 (95% CI, 0.08–0.35, p = 0.003).

Only mild to moderate laboratory abnormalities were found on follow-up. There was a significant elevation in total bilirubin levels, with a mean increase of 17 µmol/L at week 24 (95% CI, 10–23, p < 0.0001), with no difference between the two groups (Fig 2). However, there was no significant change in ALT, AST, CK, creatinine and eGFR during follow-up. In the ATV/r+RAL group, there were no significant differences in total cholesterol, high-density lipoprotein (HDL), low-density lipoprotein (LDL) cholesterol or triglyceride levels at different time points of follow-up. However, in the ATV+RAL group, there were significant reductions from baseline in: total cholesterol level with a mean reduction of 0.82 mmol/L (95% CI, 0.19–1.45, p = 0.01), HDL level with a mean reduction of 0.40 mmol/L (95% CI, 0.04–0.75, p = 0.03), and triglyceride level with a mean reduction of 0.49 mmol/L (95% CI, 0.03–0.97, p = 0.04) at 96 weeks of treatment.

### Pharmacokinetics

A total of 155 and 135 ATV and RAL plasma measurements were assessed, respectively. Overall, median ATV and RAL concentrations were of 550 ng/mL (IQR, 300–1195) and 121 ng/mL (IQR, 55–289), respectively. During follow-up, targeted minimum trough ATV concentrations (200 ng/mL) were achieved in 84% of patients and 87% of patients had a RAL level above the 95% inhibitory concentration (15 ng/mL) [32].

The geometric mean trough concentrations of both ATV and RAL are shown in Table 4. Once daily RAL was associated with lower steady-state values than twice daily, with a GMR of 0.40 (90% CI, 0.22–0.72). Both ATV and RAL concentrations were significantly higher in ritonavir-boosted regimen, with a GMR of 1.81 (90% CI, 1.19–2.78) and 2.04 (90% CI, 1.25–3.34), respectively. Unboosted ATV concentrations were similar between 400 mg QD and 200 mg BID-dosing strategies.



**Fig 2. Changes from baseline in main laboratory parameters.** ATV/r or ATV: Boosted or Unboosted Atazanavir; RAL: Raltegravir; ALT: Alanine aminotransferase; HDL: High-density lipoprotein; LDL: Low-density lipoprotein.

doi:10.1371/journal.pone.0164240.g002

**Table 4. ATV and RAL pharmacokinetic parameters in different dosing strategies.**

|                          | Dosage, n | Dosage Timing | C <sub>trough</sub> Geometric mean, ng/mL (90% CI) | GMR (90% CI)     |
|--------------------------|-----------|---------------|--|------------------|
| ATV                      | 155       |               |  |                  |
| With RTV                 | 40        | NA            | 766.5 (506.5–1160.0)                               | 1.81 (1.19–2.78) |
| Without RTV              | 115       | NA            | 424.5 (345.4–521.6)                                |                  |
| 200 mg BID (without RTV) | 53        | 12 h          | 337.1 (237.9–477.6)                                | 1.08 (0.50–2.36) |
| 400 mg QD (without RTV)  | 16        | 24 h          | 311.8 (123.9–784.8)                                |                  |
| 300 mg BID (without RTV) | 22        | 12 h          | 866.8 (689.0–1090.6)                               | 2.35 (1.64–3.35) |
| 600 mg QD (without RTV)  | 11        | 24 h          | 369.4 (280.9–485.6)                                |                  |
| RAL                      | 135       |               |  |                  |
| With RTV                 | 92        | NA            | 141.0 (107.3–185.1)                                | 2.04 (1.25–3.34) |
| Without RTV              | 43        | NA            | 69.1 (44.6–107.1)                                  |                  |
| 800 mg QD                | 24        | 24 h          | 52.7 (29.5–94.3)                                   | 0.40 (0.22–0.72) |
| 400 mg BID               | 111       | 12 h          | 132.3 (102.8–170.2)                                |                  |

ATV: Atazanavir; CI, Confidence interval; C<sub>trough</sub>: Trough Concentration; GMR: Geometric Mean Ratio; NA: Not applicable; RAL: Raltegravir; RTV: Ritonavir.

doi:10.1371/journal.pone.0164240.t004

Both ATV and RAL high trough concentrations were not linked to therapeutic failure or discontinuations due to adverse events.

## Discussion

Long-life ART poses significant challenge to effective and tolerated therapeutic intervention, especially among heavily pretreated and ageing patients. Indeed, treatment modification is not always simple in heavily ART-experienced patients, due to previous adverse events and/or ART resistance mutations. Evaluating a NRTI-sparing regimen in a large prospective cohort, we showed that ATV and RAL dual therapy had moderate efficacy for lengthy period of time in these patients, mostly due to adverse events and virological failures. Moreover, an emerging RAL-resistance risk at virological failure was encountered (0.4% at week 24, 1.4% at week 48 and 1.4% at week 96). We showed that there was no significant difference between ritonavir-boosted and unboosted strategies in efficacy and tolerance laboratory parameters, except for lipid profiles.

Other studies showed moderate efficacy rates of this dual therapy [16–19,30]. The HARNES study enrolled experienced patients, with undetectable viremia, randomized to receive ATV/r+RAL or ATV/r plus tenofovir/emtricitabine [30]. At week 48, switching to ATV/r+RAL resulted in lower therapeutic success rate (69.4%) than ATV/r plus tenofovir/emtricitabine (86.5%). In our real-life study, we found similar rates of virological suppression at week 48 (65.4%) compared to the HARNES trial. Similarly to the SPARTAN study, RAL-resistance emerged among patients experiencing virological failure (4/31 patients with available genotypes) [15]. Rates of emerging resistance in subjects who failed dual therapy further support resistance testing in case of virological failure. Although we did not perform a multiple comparison adjustment, we identified significant predictors of virological failure on dual therapy by multivariate analysis. Virological failure on dual therapy was strongly associated with high HIV-1 RNA zenith and low CD4+ T-cell count at baseline, whether patients had HIV-1 RNA <50 or >50 copies/mL at baseline. Both parameters have been correlated with high HIV reservoir levels [33,34]. So, we might hypothesize there is a link between HIV reservoir and virological failure on dual therapy. Measuring HIV-1 DNA before switching might help adapting simplification strategies and select patients [14,35]. Besides, a short duration on ART has also been associated with virological failure. This might be related with time spent on suppressed plasma HIV-1 RNA under successful ART before switching to dual therapy. Indeed, long-term virological control was associated with decreased rates of low-level viremia [36] and HIV reservoir [37]. We can hypothesize that this two drug-containing regimen was not efficient enough to maintain viral suppression among patients who recently obtained virological control.

Regarding laboratory abnormalities, dual therapy showed moderate toxicity rates as 44 (16%) participants discontinued because of adverse events through week 96. Lower rates of discontinuations over a similar period and for a similar patient population have been reported with other regimen switches [8]. Higher rates of discontinuations due to adverse events were found for highly ART-exposed patients. Results of bilirubin elevations presented herein are similar if not actually better than those of the pilot studies where 13.0 to 20.6% of grade 3 or 4 total bilirubin abnormalities were described [15,16,30]. Switching for ATV+RAL yielded a significant decrease in triglycerides, HDL and total cholesterol between baseline and week 96. This result is surprising as some other ART regimen showed lipid-lowering effects, such as tenofovir [38]. In our study, this may be due to ritonavir stopping when switching to dual therapy [39].

Pharmacokinetic results supported the twice daily use of RAL 400 mg and were in keeping with data from the literature [17,40,41]. Coadministration of ATV and RAL is known to

increase RAL exposures [42–44], which explain why both ATV and RAL trough concentrations increased with ritonavir association. Although, ATV exposure was higher with ritonavir-boosted regimen, bilirubin elevation was not significantly different from unboosted regimen. Of major importance, a high proportion of patients achieved targeted trough concentrations for both ATV and RAL on dual therapy.

To the best of our knowledge, this is the first study that compared long-term immunovirological outcomes of switching to ATV and RAL dual therapy between boosted and unboosted strategies. Although this study has several limitations inherent to the DAT' AIDS cohort design, as the retrospective design and the mixed population (patients with both undetectable and detectable viremia at baseline) [31], we confirmed a moderate efficacy and safety profile of switching to ATV and RAL dual therapy in a “real-life” setting [30]. All efficacy and safety parameters were similar in patients treated with ATV+RAL versus ATV/r+RAL. Our results suggest that dual therapy could possibly be initiated in selected patients, according to the risk of virological failure that may be linked to a high HIV reservoir, and the risk of emerging RAL-resistance at virological failure. Patients with favorable immunovirologic profile (i.e. low HIV reservoir with a long duration on efficient ART) might benefit from drug reducing to dual ATV and RAL therapy.

## Acknowledgments

The data were presented at the 15<sup>th</sup> European AIDS Conference (EACS) October 21–24, 2015, in Barcelona, Spain (Abstract PE8/40).

Members of the Dat' AIDS study group: C. Allavena, E. Billaud, C. Biron, B. Bonnet, S. Bouchez, D. Boutoille, C. Brunet, T. Jovelin, N. Hall, C. Bernaud, P. Morineau, V. Reliquet, O. Aubry, P. Point, M. Besnier, O. Grossi, M. Lefebvre, H. Hüe, M. Cavellec, A. Soria, S. Pineau, E. André-Garnier, A. Rodallec (Nantes); S. Brégigeon, O. Faucher, V. Oby-Roguet, M. Orticoni, M.J. Soavi, I. Luquet-Besson, E. Ressiot, I. Pinot, M.J. Ducassou, H. Bertone, S. Gallie, S. Trijau, A.S. Ritleng, A. Ivanova, M. Guignard, C. Blanco-Betancourt, I. Poizot-Martin (Marseille); M. Alvarez, N. Biezunski, L. Cuzin, A. Debard, P. Delobel, C. Delpierre, C. Fourcade, B. Marchou, G. Martin-Blondel, L. Porte, M. Mularczyk, D. Garipuy, K. Saune, I. Lepain, M. Marcel, E. Puntis (Toulouse); P. Pugliese, C. Ceppi, E. Cua, J. Cottalorda, P. Dellamonica, E. Demonchy, B. Dunais, J. Durant, C. Etienne, S. Ferrando, J.G. Fuzibet, R. Garraffo, K. Risso, V. Mondain, A. Naqvi, N. Oran, I. Perbost, S. Pillet, B. Prouvost-Keller, C. Pradier, S. Wehrlen-Pugliese, E. Rosenthal, S. Sausse, P.M. Roger (Nice); Ph. Choisy, S. Vandame, Th. Huleux, F. Ajana, I. Alcaraz, V. Baclet, T.H. Huleux, H. Melliez, N. Viget, M. Valette, E. Aissi, Ch. Allienne, A. Meybeck, B. Riff (Tourcoing); R. Agher, C. Katlama, M.A. Valantin, C. Duvivier, V. Joly, Y. Yazdanpanah, R. Landman, C. Mackoumbou-Nkouka, F. Louni, Z. Julia, C. Charpentier, D. Descamps (Paris); L. Cotte, D. Peyramond, C. Chidiac, T. Ferry, F. Ader, F. Biron, A. Boibieux, P. Mialhes, T. Perpoint, I. Schlienger, F. Dahoud, J. Lippmann, E. Braun, J. Koffi, C. Longuet, V. Guéripel, C. Augustin-Normand, S. Degroodt (Lyon); D. Rey, M.L. Batard, C. Bernard-Henry, C. Cheneau, E. de Mautort, P. Fischer, M. Partisani, M. Priester, P. Gantner (Strasbourg); F. Bani-Sadr, C. Rouger, J.L. Berger, Y. N'Guyen, D. Lambert, I. Kmiec, M. Hentzien, D. Lebrun (Reims).

Author contact for this group: Dr David Rey, Le Trait d'Union, Centre de Soins de l'Infection par le VIH. 1, place de l'Hôpital 67091 STRASBOURG cedex France. [david.rey@chru-strasbourg.fr](mailto:david.rey@chru-strasbourg.fr)

We thank all the patients, staff of the HIV clinical centers who participated in the study.

## Author Contributions

**Conceptualization:** PG FBS DR.

**Data curation:** TJ.

**Formal analysis:** PG MT.

**Investigation:** FBS RG PMR PP DR.

**Methodology:** PG DR.

**Writing – original draft:** PG DR.

**Writing – review & editing:** FBS RG TJ PMR PP.

## References

1. Morlat P, Roussillon C, Henard S, Salmon D, Bonnet F, Cacoub P, et al. Causes of death among HIV-infected patients in France in 2010 (national survey): trends since 2000. *AIDS* 2014; 28: 1181–91. doi: [10.1097/QAD.0000000000000222](https://doi.org/10.1097/QAD.0000000000000222) PMID: [24901259](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24901259/)
2. Smith C, Sabin CA, Lundgren JD, Thiebaut R, Weber R, Law M, et al. Factors associated with specific causes of death amongst HIV-positive individuals in the D:A:D Study. *AIDS* 2010; 24: 1537–48. PMID: [20453631](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20453631/)
3. Bavinger C, Bendavid E, Niehaus K, Olshen RA, Olkin I, Sundaram V, et al. Risk of cardiovascular disease from antiretroviral therapy for HIV: a systematic review. *PLoS One* 2013; 8: e59551. doi: [10.1371/journal.pone.0059551](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0059551) PMID: [23555704](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23555704/)
4. Reinsch N, Neuhaus K, Esser S, Potthoff A, Hower M, Mostardt S, et al. Are HIV patients under-treated? Cardiovascular risk factors in HIV: results of the HIV-HEART study. *Eur J Prev Cardiol* 2012; 19: 267–74.
5. Duval X, Baron G, Garelik D, Villes V, Dupré T, Lepout C, et al. Living with HIV, antiretroviral treatment experience and tobacco smoking: results from a multisite cross-sectional study. *Antivir Ther* 2008; 13: 389–97. PMID: [18572752](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18572752/)
6. El-Sadr WM, Lundgren J, Neaton JD, Gordin F, Abrams D, Arduino RC, et al. CD4+ count-guided interruption of antiretroviral treatment. *N Engl J Med* 2006; 355: 2283–96. doi: [10.1056/NEJMoa062360](https://doi.org/10.1056/NEJMoa062360) PMID: [17135583](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17135583/)
7. Katlama C, Assoumou L, Valantin MA, Soulié C, Duvivier C, Chablais L, et al. Maraviroc plus raltegravir failed to maintain virological suppression in HIV-infected patients with lipohypertrophy: results from the ROCnRAL ANRS 157 study. *J Antimicrob Chemother* 2014; 69: 1648–52. doi: [10.1093/jac/dkt536](https://doi.org/10.1093/jac/dkt536) PMID: [24535278](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24535278/)
8. Monteiro P, Perez I, Laguno M, Martínez-Rebollar M, González-Cordon A, Lonca M, et al. Dual therapy with etravirine plus raltegravir for virologically suppressed HIV-infected patients: a pilot study. *J Antimicrob Chemother* 2014; 69: 742–8. doi: [10.1093/jac/dkt406](https://doi.org/10.1093/jac/dkt406) PMID: [24128667](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24128667/)
9. Soulié C, Assoumou L, Darty M, Rodriguez C, Donati F, Sayon S, et al. Virological factors associated with outcome of dual maraviroc/raltegravir therapy (ANRS-157 trial). *J Antimicrob Chemother* 2015. (in press)
10. Katlama C, Valantin MA, Algarte-Genin M, Duvivier C, Lambert-Niclot S, Girard PM, et al. Efficacy of darunavir/ritonavir maintenance monotherapy in patients with HIV-1 viral suppression: a randomized open-label, noninferiority trial, MONOI-ANRS 136. *AIDS* 2010; 24: 2365–74. PMID: [20802297](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20802297/)
11. Arribas JR, Horban A, Gerstoft J, Fätkenheuer G, Nelson M, Clumeck N, et al. The MONET trial: darunavir/ritonavir with or without nucleoside analogues, for patients with HIV RNA below 50 copies/ml. *AIDS* 2010; 24: 223–30. doi: [10.1097/QAD.0b013e3283348944](https://doi.org/10.1097/QAD.0b013e3283348944) PMID: [20010070](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20010070/)
12. Lambert-Niclot S, Flandre P, Valantin MA, Peytavin G, Sayon S, Morand-Joubert L, et al. Resistant minority species are rarely observed in patients on darunavir/ritonavir monotherapy. *J Antimicrob Chemother* 2012; 67: 1470–4. doi: [10.1093/jac/dks052](https://doi.org/10.1093/jac/dks052) PMID: [22396434](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22396434/)
13. Antinori A, Clarke A, Svedhem-Johansson V, Arribas JR, Arenas-Pinto A, Fehr J, et al. Week 48 efficacy and central nervous system analysis of darunavir/ritonavir monotherapy versus darunavir/ritonavir with two nucleoside analogues. *AIDS* 2015; 29: 1811–20. doi: [10.1097/QAD.0000000000000778](https://doi.org/10.1097/QAD.0000000000000778) PMID: [26372387](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26372387/)
14. Lambert-Niclot S, Flandre P, Valantin MA, Peytavin G, Duvivier C, Haim-Boukobza S, et al. Factors associated with virological failure in HIV-1-infected patients receiving darunavir/ritonavir monotherapy. *J Infect Dis* 2011; 204: 1211–6. doi: [10.1093/infdis/jir518](https://doi.org/10.1093/infdis/jir518) PMID: [21917894](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21917894/)
15. Kozal MJ, Lupo S, DeJesus E, Molina JM, McDonald C, Raffi F, et al. A nucleoside- and ritonavir-sparing regimen containing atazanavir plus raltegravir in antiretroviral treatment-naïve HIV-infected

- patients: SPARTAN study results. *HIV Clin Trials* 2012; 13: 119–30. doi: [10.1310/hct1303-119](https://doi.org/10.1310/hct1303-119) PMID: [22592092](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22592092/)
16. Carey D, Pett SL, Bloch M, Wand H, MacRae K, Beileiter K, et al. A randomized study of pharmacokinetics, efficacy, and safety of 2 raltegravir plus atazanavir strategies in ART-treated adults. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2012; 60: 143–9. doi: [10.1097/QAI.0b013e318252f97e](https://doi.org/10.1097/QAI.0b013e318252f97e) PMID: [22421745](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22421745/)
  17. Cordery DV, Hesse K, Amin J, Cooper DA. Raltegravir and unboosted atazanavir dual therapy in virologically suppressed antiretroviral treatment-experienced HIV patients. *Antivir Ther* 2010; 15: 1035–8. doi: [10.3851/IMP1647](https://doi.org/10.3851/IMP1647) PMID: [21041919](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21041919/)
  18. Gupta S, Lataillade M, Farber S, Kozal MJ. Raltegravir with unboosted atazanavir 300 mg twice daily in antiretroviral treatment-experienced participants. *J Int Assoc Physicians AIDS Care (Chic)* 2009; 8: 87–92.
  19. Gantner P, Koepfel C, Partisani M, Batard ML, Bernard-Henry C, Cheneau C, et al. Efficacy and safety of switching to raltegravir plus atazanavir dual therapy in pretreated HIV-1-infected patients over 144 weeks: a cohort study. *Scand J Infect Dis* 2014; 46: 838–45. doi: [10.3109/00365548.2014.947318](https://doi.org/10.3109/00365548.2014.947318) PMID: [25229167](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25229167/)
  20. Kelesidis T, Tran TT, Stein JH, Brown TT, Moser C, Ribaudo HJ, et al. Changes in Inflammation and Immune Activation With Atazanavir-, Raltegravir-, Darunavir-Based Initial Antiviral Therapy: ACTG 5260s. *Clin Infect Dis* 2015; 61: 651–60. doi: [10.1093/cid/civ327](https://doi.org/10.1093/cid/civ327) PMID: [25904376](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25904376/)
  21. McComsey GA, Kitch D, Daar ES, Tierney C, Jahed NC, Melbourne K, et al. Inflammation markers after randomization to abacavir/lamivudine or tenofovir/emtricitabine with efavirenz or atazanavir/ritonavir. *AIDS* 2012; 26: 1371–85. doi: [10.1097/QAD.0b013e328354f4fb](https://doi.org/10.1097/QAD.0b013e328354f4fb) PMID: [22546988](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22546988/)
  22. Lake J, McComsey G, Hulgian T, Wanke CA, Mangili A, Walmsley SL, et al. Switch to raltegravir decreases soluble CD14 in virologically suppressed overweight women: the Women, Integrase and Fat Accumulation Trial. *HIV Med*. 2014; 15(7): 431–41. doi: [10.1111/hiv.12128](https://doi.org/10.1111/hiv.12128) PMID: [24506429](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24506429/)
  23. Martínez E, D'Albuquerque PM, Llibre JM, Gutierrez F, Podzamczar D, Antela A, et al. Changes in cardiovascular biomarkers in HIV-infected patients switching from ritonavir-boosted protease inhibitors to raltegravir. *AIDS*. 2012; 26(18): 2315–26. doi: [10.1097/QAD.0b013e328359f29c](https://doi.org/10.1097/QAD.0b013e328359f29c) PMID: [23018438](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23018438/)
  24. Silva EF, Charreau I, Gourmel B, Mourah S, Kalidi I, Guillon B, et al. Decreases in inflammatory and coagulation biomarkers levels in HIV-infected patients switching from enfuvirtide to raltegravir: ANRS 138 substudy. *J Infect Dis*. 2013; 208(6): 892–7. doi: [10.1093/infdis/jit280](https://doi.org/10.1093/infdis/jit280) PMID: [23801606](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23801606/)
  25. Gupta SK, Mi D, Moe SM, Dubé MP, Liu Z. Effects of switching from efavirenz to raltegravir on endothelial function, bone mineral metabolism, inflammation, and renal function: a randomized, controlled trial. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2013; 64(3): 279–83. PMID: [24278992](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24278992/)
  26. Xiang N, James M, Walters S, Bamford A, Foster C. Improved serum cholesterol in paediatric patients switched from suppressive lopinavir-based therapy to boosted darunavir or atazanavir: an 18-month retrospective study. *HIV Med* 2014; 15: 635–6. doi: [10.1111/hiv.12180](https://doi.org/10.1111/hiv.12180) PMID: [25334035](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25334035/)
  27. Squires KE, Young B, Dejesus E, Bellos N, Murphy D, Zhao HH, et al. Similar efficacy and tolerability of atazanavir compared with atazanavir/ritonavir, each with abacavir/lamivudine after initial suppression with abacavir/lamivudine plus ritonavir-boosted atazanavir in HIV-infected patients. *AIDS* 2010; 24: 2019–27. doi: [10.1097/QAD.0b013e32833bee1b](https://doi.org/10.1097/QAD.0b013e32833bee1b) PMID: [20613461](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20613461/)
  28. Ofotokun I, Na LH, Landovitz RJ, Ribaudo HJ, McComsey GA, Godfrey C, et al. Comparison of the metabolic effects of ritonavir-boosted darunavir or atazanavir versus raltegravir, and the impact of ritonavir plasma exposure: ACTG 5257. *Clin Infect Dis* 2015; 60: 1842–51. doi: [10.1093/cid/civ193](https://doi.org/10.1093/cid/civ193) PMID: [25767256](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25767256/)
  29. Eron JJ, Young B, Cooper DA, Youle M, Dejesus E, Andrade-Villanueva J, et al. Switch to a raltegravir-based regimen versus continuation of a lopinavir-ritonavir-based regimen in stable HIV-infected patients with suppressed viraemia (SWITCHMRK 1 and 2): two multicentre, double-blind, randomised controlled trials. *Lancet* 2010; 375: 396–407. doi: [10.1016/S0140-6736\(09\)62041-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(09)62041-9) PMID: [20074791](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20074791/)
  30. van Lunzen J, Pozniak A, Gatell JM, Antinori A, Klauk I, Serrano O, et al. Brief Report: Switch to Ritonavir-Boosted Atazanavir Plus Raltegravir in Virologically Suppressed Patients With HIV-1 Infection: A Randomized Pilot Study. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2016; 71: 538–43. doi: [10.1097/QAI.0000000000000904](https://doi.org/10.1097/QAI.0000000000000904) PMID: [26605505](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26605505/)
  31. Pugliese P, Cuzin L, Cabié A, Poizat-Martin I, Allavena C, Duvivier C, et al. A large French prospective cohort of HIV-infected patients: the Nadis Cohort. *HIV Med* 2009; 10: 504–11. doi: [10.1111/j.1468-1293.2009.00719.x](https://doi.org/10.1111/j.1468-1293.2009.00719.x) PMID: [19486189](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19486189/)
  32. Morlat P. Update 2014—Rapport 2013 sur la prise en charge médicale des personnes vivant avec le VIH. Available: <http://www.sante.gouv.fr>. Accessed July 15, 2015.
  33. Burgard M, Boufassa F, Viard JP, Garrigue I, Ruffault A, Izopet J, et al. Factors influencing peripheral blood mononuclear cell-associated HIV-1 DNA level after long-term suppressive antiretroviral therapy in 236 patients. *AIDS* 2009; 23: 2165–71. doi: [10.1097/QAD.0b013e32833032d4](https://doi.org/10.1097/QAD.0b013e32833032d4) PMID: [19657270](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19657270/)



34. Fourati S, Flandre P, Calin R, Carcelain G, Soulie C, Lambert-Niclot S, et al. Factors associated with a low HIV reservoir in patients with prolonged suppressive antiretroviral therapy. *J Antimicrob Chemother* 2014; 69: 753–6. doi: [10.1093/jac/dkt428](https://doi.org/10.1093/jac/dkt428) PMID: [24187041](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24187041/)
35. Avettand-Fenoel V, Flandre P, Chaix ML, Ghosn J, Delaugerre C, Raffi F, et al. Impact of 48 week lopinavir/ritonavir monotherapy on blood cell-associated HIV-1-DNA in the MONARK trial. *J Antimicrob Chemother* 2010; 65: 1005–7. doi: [10.1093/jac/dkq084](https://doi.org/10.1093/jac/dkq084) PMID: [20299496](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20299496/)
36. Palmer S, Maldarelli F, Wiegand A, Bernstein B, Hanna GJ, Brun SC, et al. Low-level viremia persists for at least 7 years in patients on suppressive antiretroviral therapy. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105: 3879–84. doi: [10.1073/pnas.0800050105](https://doi.org/10.1073/pnas.0800050105) PMID: [18332425](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18332425/)
37. Hocqueloux L, Avettand-Fenoël V, Jacquot S, Prazuck T, Legac E, Mélard A, et al. Long-term antiretroviral therapy initiated during primary HIV-1 infection is key to achieving both low HIV reservoirs and normal T cell counts. *J Antimicrob Chemother* 2013; 68: 1169–78. doi: [10.1093/jac/dks533](https://doi.org/10.1093/jac/dks533) PMID: [23335199](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23335199/)
38. Santos JR, Saumoy M, Curran A, Bravo I, Llibre JM, Navarro J, et al. The lipid-lowering effect of tenofovir/emtricitabine: a randomized, crossover, double-blind, placebo-controlled trial. *Clin Infect Dis* 2015; 61: 403–8. doi: [10.1093/cid/civ296](https://doi.org/10.1093/cid/civ296) PMID: [25870325](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25870325/)
39. Fabbiani M, Di Giambenedetto S, Quiros-Roldan E, Latini A, Vullo V, Antinori A, et al. Simplification to atazanavir/ritonavir+lamivudine in virologically suppressed HIV-infected patients: 24-weeks interim analysis from ATLAS-M trial. *J Int AIDS Soc* 2014; 17: 19808. doi: [10.7448/IAS.17.4.19808](https://doi.org/10.7448/IAS.17.4.19808) PMID: [25397552](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25397552/)
40. Neely M, Decosterd L, Fayet A, Les JS, Margol A, Kanani M, et al. Pharmacokinetics and pharmacogenomics of once-daily raltegravir and atazanavir in healthy volunteers. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; 54: 4619–25. doi: [10.1128/AAC.00712-10](https://doi.org/10.1128/AAC.00712-10) PMID: [20823282](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20823282/)
41. Jansen A, Colbers EP, van der Ven AJ, Richter C, Rockstroh JK, Wasmuth JC, et al. Pharmacokinetics of the combination raltegravir/atazanavir in HIV-1-infected patients. *HIV Med* 2013; 14: 449–52. doi: [10.1111/hiv.12029](https://doi.org/10.1111/hiv.12029) PMID: [23506243](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23506243/)
42. Zhu L, Butters J, Persson A, Stonier M, Comisar W, Panebianco D, et al. Pharmacokinetics and safety of twice-daily atazanavir 300 mg and raltegravir 400 mg in healthy individuals. *Antivir Ther* 2010; 15(8): 1107–14. doi: [10.3851/IMP1673](https://doi.org/10.3851/IMP1673) PMID: [21149917](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21149917/)
43. Iwamoto M, Wenning LA, Mistry GC, Petry AS, Liou SY, Ghosh K, et al. Atazanavir modestly increases plasma levels of raltegravir in healthy subjects. *Clin Infect Dis* 2008; 47: 137–40. doi: [10.1086/588794](https://doi.org/10.1086/588794) PMID: [18513146](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18513146/)
44. Cattaneo D, Ripamonti D, Baldelli S, Cozzi V, Conti F, Clementi E. Exposure-related effects of atazanavir on the pharmacokinetics of raltegravir in HIV-1-infected patients. *Ther Drug Monit* 2010; 32: 782–6. doi: [10.1097/FTD.0b013e3181fa53b7](https://doi.org/10.1097/FTD.0b013e3181fa53b7) PMID: [20926993](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20926993/)

## Efficacy and safety of dolutegravir and rilpivirine dual therapy as a simplification strategy: a cohort study

P Gantner,<sup>1</sup> L Cuzin,<sup>2,3,4</sup> C Allavena,<sup>5</sup> A Cabie,<sup>6</sup> P Pugliese,<sup>7</sup> M-A Valantin,<sup>8,9</sup> F Bani-Sadr,<sup>10</sup> V Joly,<sup>11</sup> T Ferry,<sup>12</sup> I Poizot-Martin,<sup>13</sup> R Garraffo,<sup>14</sup> G Peytavin,<sup>15,16</sup> S Fafi-Kremer<sup>1</sup> and D Rey<sup>17</sup> on behalf of the Dat'AIDS study group\*  
<sup>1</sup>Virology Laboratory, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Strasbourg, France, <sup>2</sup>INSERM, UMR 1027, Toulouse, France, <sup>3</sup>Université de Toulouse III, Toulouse, France, <sup>4</sup>CHU Toulouse, COREVIH Toulouse, Toulouse, France, <sup>5</sup>Infectious Diseases Department, CHU de Nantes, Nantes, France, <sup>6</sup>Infectious Diseases Department, CHU de Fort-de-France, Martinique, France, <sup>7</sup>Infectious Diseases Department, CHU de Nice, Nice, France, <sup>8</sup>Infectious Diseases Department, APHP Hôpital Pitié Salpêtrière, Paris, France, <sup>9</sup>Institut Pierre Louis d'épidémiologie et de Santé Publique (UMRS 1136), UPMC Univ Paris 06, INSERM, Sorbonne Universités, Paris, France, <sup>10</sup>Infectious Diseases Department, CHU de Reims, Reims, France, <sup>11</sup>Infectious Diseases Department, APHP Hôpital Bichat, Paris, France, <sup>12</sup>Infectious Diseases Department, Hospices civils de Lyon, Lyon, France, <sup>13</sup>APHM Hôpital Sainte-Marguerite, Immuno-Hematology Clinic, Aix-Marseille University, Marseille, France, <sup>14</sup>Pharmacology Laboratory, CHU de Nice, Nice, France, <sup>15</sup>AP-HP, Pharmacology Laboratory, Hôpital Bichat-Claude Bernard, Paris, France, <sup>16</sup>IAME, UMR 1137, Sorbonne Paris Cité, INSERM, Université Paris Diderot, Paris, France and <sup>17</sup>Le Trait d'Union, HIV-Infection Care Center, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Strasbourg, France

### Introduction

HIV-1 antiretroviral therapy (ART) is a life-long treatment. Its potential long-term adverse effects, in addition to the ageing process, may result in a higher incidence of non-AIDS-associated comorbidities than in general population [1,2]. To decrease pill and drug burden, reducing from standard triple therapy to a two drug-containing regimen is an option that continues to be investigated [3].

An optimal dual therapy must have potency to maintain viral suppression, in combination with a low toxicity profile and simple administration to improve adherence. Dolutegravir (DTG), an integrase strand transfer inhibitor (INSTI), and rilpivirine (RPV), a nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor (NNRTI), are two novel antiretroviral agents that are highly active and well tolerated in both ART-naïve and ART-experienced patients [4–7]. DTG + RPV [50 + 25 mg once daily (qd)] dual therapy is a nucleoside reverse transcriptase inhibitor (NRTI) and boosted protease inhibitor (PI) sparing regimen which is still under evaluation in randomized studies (i.e. Switch to Rilpivirine + Dolutegravir, SWORD studies). The advantages of this combination include the lack of interactions between the two drugs and the simple qd administration [8,9].

Correspondence: Dr Pierre Gantner, Institut de Virologie, 3, rue Koeberlé, 67000 Strasbourg, France. Tel: + 33 3 69 55 16 84; fax: + 33 3 68 85 37 50; e-mail: pierre.gantner@chru-strasbourg.fr

\*Members are listed in the Appendix.

The primary objective of this analysis was to assess viral suppression in ART-experienced patients with virological control switching to DTG + RPV in a real-life setting. Secondary objectives were to describe clinical and biological adverse events and plasma concentrations of DTG and RPV.

### Methods

#### Study design

The Dat'AIDS cohort study is a collaboration of major French HIV treatment centres (NCT02898987). These centres maintain prospective cohorts of HIV-1-infected individuals who provide written informed consent via a common electronic medical record [10]. Anonymized data for clinical events, laboratory test results and therapeutic history collected by the networking organization have been submitted to the French National Commission on Informatics and Rights (CNIL Registration number: 2001/762876/nadiscnil.doc). The local Ethics Committee of the Faculty of medicine of Strasbourg, Strasbourg, France, approved the present study.

We performed a retrospective analysis in individuals participating in the Dat'AIDS cohort with plasma HIV RNA < 50 HIV-1 RNA copies/mL on ART, without hepatitis B virus (HBV) coinfection, who were switched to DTG + RPV regimen between January 2014 and September 2015. The primary outcome measure was a mixed analysis of antiviral efficacy based on the loss of

virological and therapeutic control on dual therapy at week 24. Secondary objectives were virological and therapeutic success over follow-up, immunological response, safety and steady-state drug level.

#### Data collection

The following data were collected for each participant: demographic data, HIV disease status, previous ART, reason for changing therapy and laboratory parameters. Laboratory abnormalities were graded using the 2003 Agence Nationale de Recherche sur le Sida et les Hépatites Virales (ANRS) scale (<http://www.anrs.fr>).

#### Determination of DTG and RPV plasma concentrations

Steady-state trough plasma concentrations of DTG and RPV were determined in a subgroup of patients using liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry [11]. Measured trough concentrations were considered adequate if above the protein-adjusted 90% inhibitory concentration ( $IC_{90}$ ) of 64 ng/mL and 12.1 ng/mL for DTG and RPV, respectively [12,13].

#### Statistical considerations

Dual therapy efficacy was analysed according to the time to loss of therapeutic and/or virological response (TLOVR) algorithm. The TLOVR was estimated using the Kaplan–Meier method. Confirmed loss of virological control was defined as a plasma HIV RNA > 50 copies/mL based on two consecutive measurements within 1 month or plasma HIV RNA > 1000 copies/mL for one sample. Therapeutic failure was defined as dual therapy discontinuation, whatever the reason.

The Student's *t*-test was used to compare any changes in quantitative variables. All tests were two-tailed and performed with a level of statistical significance of 0.05.

## Results

#### Participant disposition

During the study period, 152 patients were switched to DTG + RPV dual therapy. Patients were followed for a median of 36 weeks [interquartile range (IQR) 25–50 weeks]. The participants were primarily male (66%), 42% of individuals were men who have sex with men (MSM), and they had a median age of 55 years (IQR: 48–61 years). All had been virologically controlled on ART

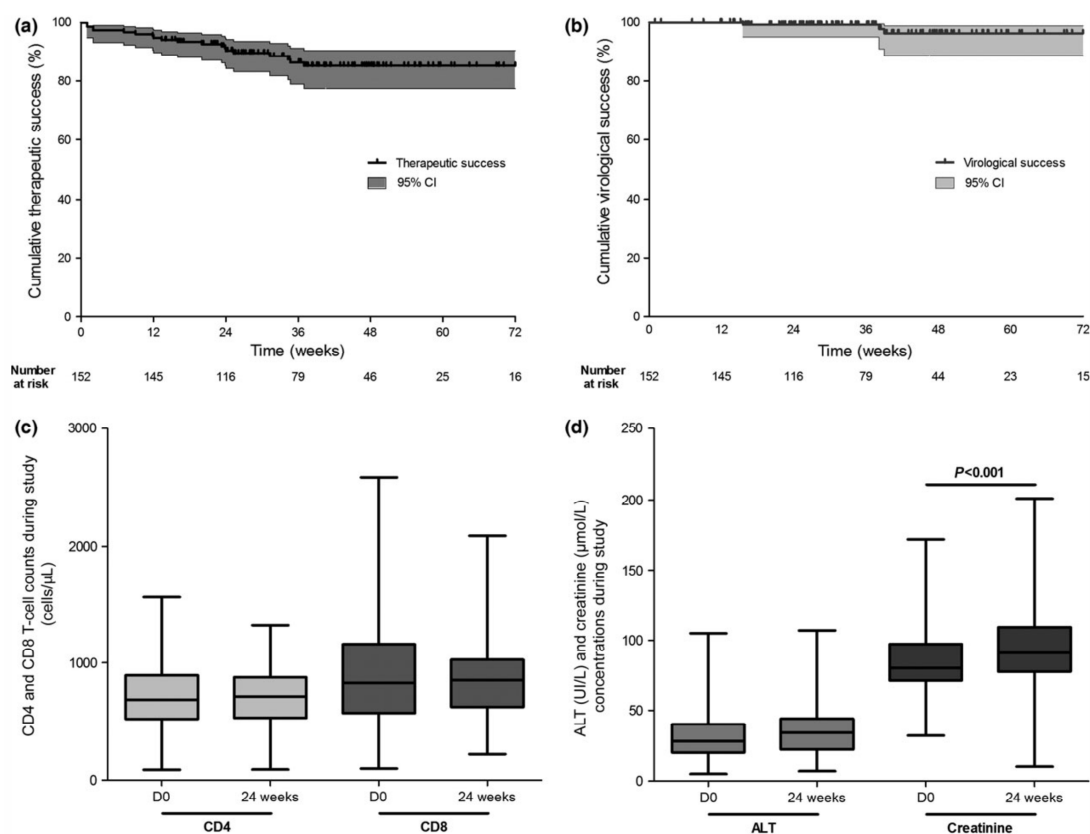
(plasma HIV RNA < 50 copies/mL) at the time of switch for a median of 10 years (IQR: 8–15 years). The patients had received a median of 9 different ART regimens (IQR: 5–14) for a median of 17 years (IQR: 5–14 years). Before dual therapy initiation, 41% of patients were INSTI-naïve. In addition, 52% of patients had experienced virological failure on a previous ART combination, but not on a previous DTG- or RPV-based regimen.

Fifty-three patients (35%) had a history of AIDS-defining events. At baseline, the median CD4 T-cell count was 669 cells/ $\mu$ L (IQR: 523–867 cells/ $\mu$ L). Before switching to dual therapy, 43% of patients had been prescribed a standard ART regimen (two NRTIs + a third agent) and 37% were already taking another dual therapy. ART was switched to DTG + RPV primarily because of intolerance to the previous regimen (47%) or for treatment simplification (30%).

#### Virological and therapeutic response

As a primary outcome measure, the cumulative percentages of patients remaining free of confirmed virological failure and therapeutic failure at week 24 on dual therapy were 99.1% [115 of 116; 95% confidence interval (CI) 95.2–99.9] and 90.5% (105 of 116; 95% CI: 83.6–93.7), respectively. The TLOVR analysis over follow-up is depicted in Figure 1a,b. At the end of the study, confirmed virological failure had occurred in three patients (2%). Of these, two patients continued DTG + RPV [plasma HIV RNA: patient 1 (previously on successful maraviroc (MVC) + raltegravir (RAL)), 130 and 51 copies/mL, respectively, at weeks 38 and 43; patient 2 (previously on successful tenofovir (TDF)/emtricitabine (FTC)/rilpivirine (RPV)), 1147 copies/mL at week 39] and achieved virological suppression up to the end of follow-up. These patients harboured wild-type viruses as assessed by RNA Sanger sequencing at failure. The third patient, who had previously been on successful abacavir (ABC)/lamivudine (3TC)/zidovudine (ZDV), experienced early virological failure, with a single plasma HIV RNA measurement of 1259 copies/mL at week 15, and achieved virological suppression again on standard ART (ABC/3TC/DTG). No RNA resistance testing before the switch and at failure was available for this patient who has since been lost to follow-up.

At the end of the study, 19 patients (13%) stopped dual therapy. Twelve patients discontinued DTG + RPV because of various and sometimes multiple adverse events: neurological disorders ( $n = 7$ ), abdominal pain ( $n = 3$ ), cutaneous effects ( $n = 1$ ) and renal toxicity ( $n = 1$ ). Other reasons for stopping DTG + RPV were: therapeutic simplification to a single-tablet regimen ( $n = 3$ ), patient's



**Fig. 1** Efficacy and safety of switching to dolutegravir + rilpivirine dual therapy. Therapeutic (a) and virological (b) success are depicted in a survival analysis. Immunological response to dual therapy (c) and toxicity biological markers (d) are compared between D0 and W24. ALT, alanine aminotransferase; CI, confidence interval.

decision ( $n = 1$ ), virological failure ( $n = 1$ ), pregnancy ( $n = 1$ ) and drug–drug interaction ( $n = 1$ ).

#### Laboratory parameters

In 106 evaluable patients after 24 weeks of DTG + RPV, no change in CD4 and CD8 T-cell counts was observed (Fig. 1c). At week 24, there was a significant increase from baseline values in creatinine (mean  $\pm$  standard deviation,  $+11.1 \pm 5.4 \mu\text{mol/L}$ ;  $P < 0.001$ ), but not in alanine aminotransferase (ALT) or aspartate aminotransferase (AST) concentration ( $P = 0.4$ ) (Fig. 1d). No grade 3 to 4 adverse events were observed.

During follow-up, DTG and RPV steady-state plasma concentrations were assessed in 23 participants with virological success. DTG and RPV median trough concentrations were 2090 ng/mL (IQR: 1255–2965 ng/mL) and

130 ng/mL (IQR: 95–160 ng/mL), respectively. DTG and RPV concentrations were all measured above the protein-adjusted  $\text{IC}_{50}$ .

#### Discussion

Simplified ART regimens are expected to reduce long-term toxicity and cost, while maintaining optimal immunological and virological efficacy. Potent dual therapy might be a good option as a drug-reducing strategy in ART-controlled patients [14]. Evaluating the effects of two novel antiretroviral drugs in a prospective study of a French cohort ( $n = 152$ ), we showed that DTG + RPV dual therapy is highly efficient in ART-controlled patients (90.5% therapeutic success at 24 weeks). Two patients experienced transient and low-level viral replication, 9 months post-switch, without

emergence of resistance mutations, and returned to suppressed viral load without ART modification [15]. Only one patient had to stop DTG + RPV treatment early because of virological failure, but resistance was not documented.

Switching to a dual DTG + RPV regimen in virologically suppressed patients seems to be as efficient as switching to a combination of two NRTIs plus RPV (therapeutic success at week 24, 94%) or DTG (therapeutic success at week 24, 79%) [5,7], and showed similar efficacy to other dual therapy [3]. Antiviral efficacy was observed whatever the type of previous ART. Information on previous genotyping, and on possible previous virological failure on the NNRTI or INSTI drug class, is essential to obtain before starting DTG + RPV, to rule out any resistance to these drugs. Compared with DTG monotherapy, a dual DTG + RPV regimen would offer a higher genetic barrier [16–18].

This dual combination was well tolerated with few discontinuations because of adverse events, mostly neurological disorders [19], showing a relatively good tolerability of DTG + RPV, compared with 47% discontinuations for adverse events on previous treatment. Only grade 1 to 2 laboratory abnormalities were observed. An elevation of serum creatinine level has been associated with DTG use in previous studies [4,5]. Moreover, adequate expected trough plasma concentrations of DTG and RPV demonstrated the favourable drug interaction profile of these two drugs in such a maintenance strategy [9].

To the best of our knowledge, there is no published study that has assessed immuno-virological outcomes of switching to DTG + RPV in a large cohort of ART-controlled patients. This study has several limitations inherent to the Dat'AIDS cohort study design [10]. Our 'real life' data have to be compared with the future results of ongoing prospective randomized studies comparing DTG + RPV dual therapy to maintenance of standard ART. These clinical studies should also assess the dynamics of HIV replication in reservoirs under DTG + RPV dual therapy [20].

## Acknowledgements

We thank all the patients and staff of the HIV clinical centres who participated in the study and Thomas Jovelin for database management.

*Conflicts of interest:* PG has received honoraria for travel/accommodation/meeting expenses from Bristol-Myers Squibb. MAV has received honoraria for travel/accommodation/meeting expenses from Janssen-Cilag, Gilead Science, ViiV, Bristol-Myers Squibb, and Merck-Sharp & Dohme-Chibret. DR has received honoraria for travel/

accommodation/meeting expenses from Gilead Science, ViiV, Bristol-Myers Squibb, and Merck-Sharp & Dohme-Chibret.

## Appendix: the Dat'AIDS study group


Members of the Dat'AIDS study group: C. Allavena, E. Billaud, C. Biron, B. Bonnet, S. Bouchez, D. Boutoille, C. Brunet, T. Jovelin, N. Hall, C. Bernaud, P. Morineau, V. Reliquet, O. Aubry, P. Point, M. Besnier, O. Grossi, M. Lefebvre, H. Hüe, M. Cavellec, A. Soria, S. Pineau, E. André-Garnier and A. Rodallec (Nantes); S. Bréigéon, O. Faucher, V. Obry-Roguet, M. Ortoni, M. J. Soavi, I. Luquet-Besson, E. Ressiot, I. Pinot, M. J. Ducassou, H. Bertone, S. Gallie, S. Trijau, A. S. Ritleng, A. Ivanova, M. Guignard, C. Blanco-Betancourt and I. Poizot-Martin (Marseille); M. Alvarez, N. Biezunski, L. Cuzin, A. Debard, P. Delobel, C. Delpierre, C. Fourcade, B. Marchou, G. Martin-Blondel, L. Porte, M. Mularczyk, D. Garipuy, K. Saune, I. Lepain, M. Marcel and E. Puntis (Toulouse); P. Pugliese, C. Ceppi, E. Cua, J. Cottalorda, P. Dellamonica, E. Demonchy, B. Dunais, J. Durant, C. Etienne, S. Ferrando, J. G. Fuzibet, R. Garraffo, K. Risso, V. Mondain, A. Naqvi, N. Oran, I. Perbost, S. Pillot, B. Prouvost-Keller, C. Pradier, S. Wehrle-Pugliese, E. Rosenthal, S. Sausse and P. M. Roger (Nice); Ph. Choisy, S. Vandame, Th. Huleux, F. Ajana, I. Alcaraz, V. Baclet, T. H. Huleux, H. Melliez, N. Viget, M. Valette, E. Aissi, Ch. Allienne, A. Meybeck and B. Riff (Tourcoing); R. Agher, C. Katlama, M. A. Valantin, C. Duvivier, V. Joly, Y. Yazdanpanah, R. Landman, C. Mackoumbou-Nkouka, F. Louni, Z. Julia, C. Charpentier and D. Descamps (Paris); L. Cotte, D. Peyramond, C. Chidiac, T. Ferry, F. Ader, F. Biron, A. Boibieux, P. Miaillhes, T. Perpoint, I. Schlienger, F. Dahoud, J. Lippmann, E. Braun, J. Koffi, C. Longuet, V. Guéripel, C. Augustin-Normand and S. Degroodt (Lyon); D. Rey, M. L. Batard, C. Bernard-Henry, C. Cheneau, E. de Mautort, P. Fischer, M. Partisani, M. Priester and P. Gantner (Strasbourg); F. Bani-Sadr, C. Rouger, J. L. Berger, Y. N'Guyen, D. Lambert, I. Kmiec, M. Hentzien and D. Lebrun (Reims).

## References

- Schouten J, Wit FW, Stolte IG *et al.* Cross-sectional comparison of the prevalence of age-associated comorbidities and their risk factors between HIV-infected and uninfected individuals: the AGEHIV cohort study. *Clin Infect Dis* 2014; **59**: 1787–1797.
- High KP, Brennan-Ing M, Clifford DB *et al.* HIV and aging: state of knowledge and areas of critical need for research. A report to the NIH Office of AIDS Research by the HIV and

- Aging Working Group. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2012; **60**: S1–S18.
- 3 Baril JG, Angel JB, Gill MJ *et al*. Dual therapy treatment strategies for the management of patients infected with HIV: a systematic review of current evidence in ARV-naïve or ARV-experienced, Virologically Suppressed Patients. *PLoS One* 2016; **11**: e0148231.
  - 4 Raffi F, Jaeger H, Quiros-Roldan E *et al*. Once-daily dolutegravir versus twice-daily raltegravir in antiretroviral-naïve adults with HIV-1 infection (SPRING-2 study): 96 week results from a randomised, double-blind, non-inferiority trial. *Lancet Infect Dis* 2013; **13**: 927–935.
  - 5 Cahn P, Pozniak AL, Mingrone H *et al*. Dolutegravir versus raltegravir in antiretroviral-experienced, integrase-inhibitor-naïve adults with HIV: week 48 results from the randomised, double-blind, non-inferiority SAILING study. *Lancet* 2013; **382**: 700–708.
  - 6 Molina JM, Cahn P, Grinsztajn B *et al*. Rilpivirine versus efavirenz with tenofovir and emtricitabine in treatment-naïve adults infected with HIV-1 (ECHO): a phase 3 randomised double-blind active-controlled trial. *Lancet* 2011; **378**: 238–246.
  - 7 Palella FJ Jr, Fisher M, Tebas P *et al*. Simplification to rilpivirine/emtricitabine/tenofovir disoproxil fumarate from ritonavir-boosted protease inhibitor antiretroviral therapy in a randomized trial of HIV-1 RNA-suppressed participants. *AIDS* 2014; **28**: 335–344.
  - 8 Sharma M, Saravolatz LD. Rilpivirine: a new non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor. *J Antimicrob Chemother* 2013; **68**: 250–256.
  - 9 Ford SL, Gould E, Chen S *et al*. Lack of pharmacokinetic interaction between rilpivirine and integrase inhibitors dolutegravir and GSK1265744. *Antimicrob Agents Chemother* 2013; **57**: 5472–5477.
  - 10 Pugliese P, Cuzin L, Cabié A *et al*. A large French prospective cohort of HIV-infected patients: the Nadis Cohort. *HIV Med* 2009; **10**: 504–511.
  - 11 Jung BH, Rezk NL, Bridges AS *et al*. Simultaneous determination of 17 antiretroviral drugs in human plasma for quantitative analysis with liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Biomed Chromatogr* 2007; **21**: 1095–1104.
  - 12 Elliot E, Amara A, Jackson A *et al*. Dolutegravir and elvitegravir plasma concentrations following cessation of drug intake. *J Antimicrob Chemother* 2016; **71**: 1031–1036.
  - 13 Mora-Peris B, Watson V, Vera JH *et al*. Rilpivirine exposure in plasma and sanctuary site compartments after switching from nevirapine-containing combined antiretroviral therapy. *J Antimicrob Chemother* 2014; **69**: 1642–1647.
  - 14 Achhra A, Mwasakifwa G, Amin J *et al*. Efficacy and safety of contemporary dual-drug antiretroviral regimens as first-line treatment or as a simplification strategy: a systematic review and meta-analysis. *Lancet HIV* 2016; **3**: e351–e360.
  - 15 Mesplède T, Wainberg MA. Resistance against integrase strand transfer inhibitors and relevance to HIV persistence. *Viruses* 2015; **7**: 3703–3718.
  - 16 Katlama C, Soulié C, Caby F *et al*. Dolutegravir as monotherapy in HIV-1-infected individuals with suppressed HIV viraemia. *J Antimicrob Chemother* 2016; **71**: 2646–2650.
  - 17 Rojas J, Blanco JL, Marcos MA *et al*. Dolutegravir monotherapy in HIV-infected patients with sustained viral suppression. *J Antimicrob Chemother* 2016; **71**: 1975–1981.
  - 18 Brenner BG, Thomas R, Blanco JL *et al*. Development of a G118R mutation in HIV-1 integrase following a switch to dolutegravir monotherapy leading to cross-resistance to integrase inhibitors. *J Antimicrob Chemother* 2016; **71**: 1948–1953.
  - 19 Kheloufi F, Allemand J, Mokhtari S *et al*. Psychiatric disorders after starting dolutegravir: report of four cases. *AIDS* 2015; **29**: 1723–1725.
  - 20 Vinuesa D, Parra-Ruiz J, Chueca N *et al*. Protease inhibitor monotherapy is not associated with increased viral replication in lymph nodes. *AIDS* 2014; **28**: 1835–1837.

# Interlaboratory quality control of total HIV-1 DNA load measurement for multicenter reservoir studies

Pierre Gantner<sup>1</sup> | Adeline Mélard<sup>2</sup> | Florence Damond<sup>3</sup> |  
Constance Delaugerre<sup>4</sup> | Julia Dina<sup>5</sup> | Marie Gueudin<sup>6</sup> |  
Anne Maillard<sup>7</sup> | Karine Sauné<sup>8</sup> | Audrey Rodallec<sup>9</sup> |  
Edouard Tuillon<sup>10</sup> | Jean-Christophe Plantier<sup>6</sup> |  
Christine Rouzioux<sup>2,11</sup> | Véronique Avettand-Fenoel<sup>2,11</sup>  |  
on behalf of the ANRS-AC11 Quantification Working Group

<sup>1</sup>Laboratoire de Virologie, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Strasbourg, France

<sup>2</sup>Université Paris-Descartes, Sorbonne Paris Cité, Faculté de Médecine, Paris, France

<sup>3</sup>INSERM, IAME, UMR, Université Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, AP-HP, Hôpital Bichat-Claude Bernard, Laboratoire de Virologie, Paris, France

<sup>4</sup>Laboratoire de Virologie, AP-HP, Hôpital Saint-Louis, Paris, France

<sup>5</sup>Normandie Univ, UNICAEN, U2RM, Department of Virology, University Hospital, Caen, France

<sup>6</sup>Laboratoire de Virologie, Hôpital Charles Nicolle, CHU de Rouen, Rouen, GRAM, Faculté de Médecine-Pharmacie, Institut de Recherche et d'Innovation en Biomédecine, Université de Rouen, Rouen, France

<sup>7</sup>Laboratoire de Virologie Hôpital Pontchaillou, Rennes, France

<sup>8</sup>INSERM, Toulouse, France Université de Toulouse, Université Paul Sabatier, CPTP, Toulouse, France

<sup>9</sup>Laboratoire de Virologie, CHU Hôtel Dieu Nantes, France

<sup>10</sup>Département de Bactériologie-Virologie, CHU de Montpellier, Université Montpellier 1/Inserm UMR, Montpellier, France

<sup>11</sup>AP-HP, Hôpital Necker Enfants Malades, Laboratoire de Virologie, Paris, France

## Correspondence

Véronique Avettand-Fenoel, AP-HP, Hôpital Necker Enfants Malades, Laboratoire de Virologie, CHU Necker, EA 7327 Université Paris Descartes, 149 rue de Sèvres 75015 Paris, France.  
Email: veronique.avettand@aphp.fr

## Funding information

Agence Nationale de Recherches sur le Sida et les Hépatites Virales

**Background:** Viral reservoirs represent an important barrier to HIV cure. Accurate markers of HIV reservoirs are needed to develop multicenter studies. The aim of this multicenter quality control (QC) was to evaluate the inter-laboratory reproducibility of total HIV-1-DNA quantification.

**Methods:** Ten laboratories of the ANRS-AC11 working group participated by quantifying HIV-DNA with a real-time qPCR assay (Biocentric) in four samples (QCMD).

**Results:** Good reproducibility was found between laboratories (standard deviation  $\leq 0.2 \log_{10}$  copies/ $10^6$  PBMC) for the three positive QC that were correctly classified by each laboratory (QC1<QC2<QC3).

**Conclusions:** Results of this QC validate the feasibility of multicenter studies using this standardized assay.

## KEYWORDS

HIV-1 DNA, interlaboratory quality control, quantification

## 1 | INTRODUCTION

The ultimate treatment goal in HIV infection would be to eradicate the virus from its reservoirs, which are the main obstacle to curative therapy.<sup>1</sup> To further study these reservoirs and to evaluate new cure strategies, several markers have been proposed<sup>2-4</sup> but none has been evaluated for using in multicenter clinical studies. Among them, total cell-associated HIV-1 DNA presents the advantage to be feasible within large series of samples and permits longitudinal studies in clinical trials (OPTIPRIM, SPARTAC...<sup>4-8</sup>). This biomarker has been widely used in both adult<sup>4-6,9</sup> and pediatric<sup>4,10-11</sup> cohorts. HIV-DNA load correlates with values obtained in the quantitative viral outgrowth assay.<sup>3</sup> It provides useful information at different stages of the infection, irrespective of combined antiretroviral therapy, and with a variety of clinical samples (blood, rectal mucosa, breast milk, and semen).<sup>4,12-13</sup> Indeed, it has independent predictive value for progression to AIDS and death.<sup>4</sup> Total HIV-1 DNA load in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) correlates with biomarkers of inflammation and immune activation<sup>4,14</sup> and residual plasma viremia during antiretroviral therapy.<sup>4,15</sup> Total HIV-1 DNA load could be an accurate, clinically relevant marker for therapeutic decision-making.<sup>4</sup> For example, some treatment de-escalation may not be appropriate for patients with high HIV-1 DNA levels, as stated in recent French guidelines. Baseline HIV-1 DNA levels might prove helpful for choosing patients who will be the best candidates to some therapeutic strategies.<sup>4</sup> It might also prove useful for estimating HIV-1 reservoir to evaluate therapeutic strategies in multicenter trials.<sup>4</sup> Finally, HIV-1 DNA can provide useful information, along with other markers, for HIV cure research.<sup>16-17</sup>

Several home-made HIV-1 DNA quantification assays by PCR have been used worldwide with different regions amplified and using various standards for quantification and various units,<sup>3,7,18-19</sup> making difficult comparisons between studies. One real-time qPCR *LTR* HIV-1 DNA assay has been developed by the AC11 working group of the Agence Nationale de Recherches sur le SIDA et les hépatites virales (ANRS). This assay is now commercialized (Generic HIV DNA CELL, Biocentric, Bandol, France) and available for the scientific community.<sup>17</sup>

In the current context of therapeutic trials to reduce the HIV reservoir, it is essential to be able to develop multicenter studies. The aim of this national multicenter quality control was to evaluate the inter-laboratory reproducibility of total HIV-1 DNA quantification in ten French laboratories using the same assay (Generic HIV DNA CELL, Biocentric).

## 2 | MATERIAL AND METHODS

Ten laboratories of the AC11 Viral Quantification Working Group of ANRS participated in the qualitative HIV-1 DNA international QCMD quality control ([www.qcmd.org/](http://www.qcmd.org/)) in 2016. Four coded samples of freeze-dried PBMC pellets were used as the blind test panel and sent to each laboratory. It contained three samples (QC1, QC2, QC3) with HIV-1-infected PBMC, and one (QC4) with PBMC from an uninfected individual. QCMD indicated that QC1, QC2, and QC3 were obtained by dilutions of the same sample. Cell-associated HIV-1 DNA was searched and quantified by real-time PCR with the same Generic HIV DNA CELL assay kit (Biocentric) in the ten laboratories. The performances of this assay have been described previously.<sup>17</sup> Notably the 95% and 50% detection thresholds for the assay were set at six and

**TABLE 1** Procedural characteristics used in the ten laboratories and HIV-1 DNA loads obtained for the quality controls

|                    | Procedural characteristics               |   |                   | HIV-1 DNA load (copies/10 <sup>6</sup> PBMC)<br>log <sub>10</sub> copies/10 <sup>6</sup> PBMC |            |            |     |
|--------------------|--|---|-------------------|---|------------|------------|-----|
|                    | Extraction method                        | Method to determine the total DNA concentration | Thermocycler      | QC1   | QC2        | QC3        | QC4 |
| Lab 1              | Automatic Qiagen (Qiasymphony)           | Albumin qPCR                                    | ABI 7500          | (110) 2,0   | (626) 2,8  | (1232) 3,1 | ND  |
| Lab 2              | Automatic Qiagen (Qiacube)               | Nanodrop  | LC 480            | Detected <1,8   | (495) 2,7  | (2530) 3,4 | ND  |
| Lab 3              | Manuel Qiagen (Qiamp DNA Blood)          | Nanodrop  | CFX96             | (181) 2,3   | (746) 2,9  | (2371) 3,4 | ND  |
| Lab 4              | Automatic Qiagen (EZ1 Advanced XL)       | Nanodrop  | SmartCycler       | (102) 2,0   | (352) 2,5  | (1935) 3,3 | ND  |
| Lab 5              | Manuel Qiagen (Qiamp DNA Blood)          | Nanodrop  | StepOnePlus       | (138) 2,1   | (706) 2,9  | (4197) 3,6 | ND  |
| Lab 6              | Automatic Qiagen (Qiasymphony)           | Nanodrop  | Rotorgene Q6 plex | (172) 2,2   | (667) 2,8  | (3000) 3,5 | ND  |
| Lab 7              | Automatic Qiagen (Qiacube)               | Nanodrop  | MiniOpticon       | (121) 2,1   | (970) 3,0  | (1485) 3,2 | ND  |
| Lab 8              | Manuel Qiagen (Qiamp DNA Blood)          | Nanodrop  | LC 480            | (55) 1,7  | (1196) 3,1 | (4973) 3,7 | ND  |
| Lab 9              | Automatic Qiagen (Qiasymphony)           | Albumin qPCR                                    | ABI 7500          | (109) 2,0   | (600) 2,8  | (3374) 3,5 | ND  |
| Lab 10             | Manuel Macherey-Nagel (Nucleospin Blood) | Nanodrop  | LC 480            | (49) 1,7  | (550) 2,7  | (1530) 3,2 | ND  |
| Median             |  |   |                   | (110) 2,0   | (647) 2,8  | (2451) 3,4 |     |
| Standard deviation |  |   |                   | 0.2   | 0.2        | 0.2        |     |

ND, not detected.



three copies/PCR, that is, 40 and 20 copies/ $10^6$  cells, respectively (1.6 and 1.3 log), when studying 1  $\mu$ g total DNA per PCR.<sup>17</sup> All laboratories obtained a good quality score of 0 with the qualitative analysis performed by the QCMD staff. So we decided to collect quantitative results to analyze inter-laboratories reproducibility.

DNA extraction procedure consisted of the automated Qiagen method (Courtaboeuf, France) in six laboratories, the manual QIAamp DNA minikit (Qiagen) in three laboratories, and the manual NucleoSpin Blood kit (Macherey-Nagel, Hoerdt, France) in one laboratory (Table 1). The final eluate volume ranged from 50 to 100  $\mu$ L. The total DNA concentration was determined by fluorescence reading at 260 nm by the Nanodrop method (Labtech, Ringmer, UK) in eight laboratories, and by concurrently amplifying a housekeeping gene by real-time PCR in two laboratories (Table 1). In the Generic HIV DNA CELL kits, the 8E5 cell line was used as standard for HIV-1 DNA quantification. Following the manufacturer's instructions, four dilutions of an extract of 8E5 cells were performed in order to deposit 6000 copies/PCR, 600 copies/PCR, 60 copies/PCR, and 6 copies/PCR.<sup>7</sup> Quantitative results were normalized in number of copies per million cells as described previously.<sup>7</sup> Quantitative data reported by the 10 laboratories in  $\log_{10}$  copies/million cells were then compared. Logs were used as usually performed for real-time PCR assays and as discussed by Kotton et al.<sup>20</sup> Median and standard deviation were calculated for each positive sample of the quality control (QC1, QC2, QC3).

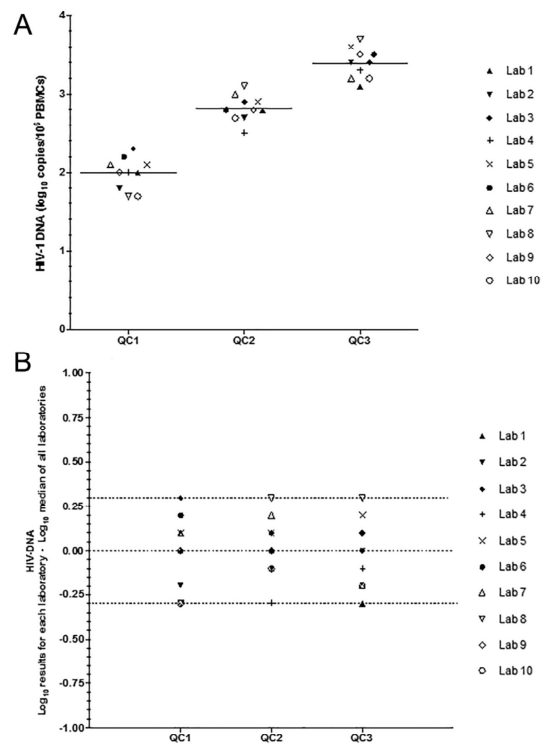
### 3 | RESULTS

None of the 10 laboratories obtained a positive result with the negative sample (QC4).

Assay performance was analyzed with the three samples of HIV-1-infected PBMC (QC1, QC2, QC3). All three samples were positive and measurable in all 10 laboratories, with the exception of QC1, which was detected but lower than the quantification threshold (70 copies/million PBMC) in one laboratory owing to unsuccessful QIAcube extraction (<2  $\mu$ g/mL).

The ranges were 1.7-2.3  $\log_{10}$  copies/ $10^6$  PBMC for QC1, 2.5-3.1  $\log_{10}$  copies/ $10^6$  PBMC for QC2, and 3.1-3.7  $\log_{10}$  copies/ $10^6$  PBMC for QC3 (Fig. 1A). The median values and standard deviations (SD) were  $2.0 \pm 0.2 \log_{10}$  copies/ $10^6$  PBMC for QC1,  $2.8 \pm 0.2 \log_{10}$  for QC2, and  $3.4 \pm 0.2 \log_{10}$  for QC3, and a 95% confidence interval of 0.12 log for each QC. There was no noteworthy influence of the HIV-1 DNA level on the dispersal of values obtained in the 10 laboratories. The results of the ten laboratories showed that the three positive quality controls were correctly classified by each of them: QC1 < QC2 < QC3. The study of variations of HIV-DNA loads between laboratories showed that the load for each control quality was comprised in the range (median - 0.3 log; median + 0.3 log) for each laboratory (Fig. 1B).

Noteworthy, the 10 laboratories quantified HIV-DNA with one of three different batches of the Generic HIV DNA CELL assay kit. The results were similar regardless of the batch used. Despite the use of different extraction methods and the different amounts of DNA analyzed per well (between 0.1 and 1  $\mu$ g of DNA per well, depending



**FIGURE 1** Variations of HIV-1 DNA results for the three positive quality controls. (A) HIV-1 DNA results for QC1, QC2, and QC3 in each laboratory. (B) Differences between the result of each laboratory and the median of HIV-DNA load in log copies/million PBMC. One laboratory had detected QC1 but it was not quantifiable (positive <1.84 log). This result was considered at the threshold in the figure. Dotted lines indicate median values  $\pm 0.3$  log

on the concentration of total DNA in the extract), results were reproducible within a small range (Fig. 1B).

### 4 | DISCUSSION

Several markers have been proposed to estimate the size of HIV reservoir,<sup>4</sup> but none is definitely considered as the best one. Among them, total cell-associated HIV DNA load is likely to become an increasingly important marker for the management of HIV-1 infection for several reasons: it is easy to perform in parallel to HIV RNA on the same clinical samples,<sup>7</sup> it is clinically relevant at the different stages of HIV infection,<sup>4</sup> and can be used in research protocols for clinical trials and studies concerning HIV pathogenesis and HIV cure.<sup>16-17</sup>

The reproducibility of a the real-time qPCR LTR HIV-1 DNA assay (Generic HIV DNA CELL, Biocentric) has been previously evaluated in one laboratory for a high-level positive-control sample with mean and standard deviation of 3.30 log copies/ $10^6$  leukocytes and 0.11 log, respectively, and for a moderate-level positive-control sample with 2.40 log copies/ $10^6$  leukocytes and 0.18 log.<sup>4</sup>

In this study, we describe the first inter-laboratory external quality control of HIV-1 DNA quantification, implicating ten French virological laboratories, using the same commercial assay. No such study has ever been performed for the other markers proposed to estimate the HIV reservoir size. This multicenter evaluation showed that there was a good agreement of HIV-1 DNA loads obtained in ten laboratories by using the standardized Generic HIV DNA CELL assay.<sup>7</sup> A limit of this study is the low number of QCMD samples. However, QCMD is an external international control, bringing the opportunity to evaluate all laboratories in the same conditions. Interestingly, the three samples were at clinically relevant HIV-1 DNA levels.<sup>4</sup> All laboratories detect and quantitate HIV-1 DNA loads with a low standard deviation of 0.2 log. As indicated in Fig. 1, the differences between median of each quality control and result of each laboratory is lower than 0.5 log, as recommended by Kotton et al.<sup>20</sup> Transplantation 2010. Actually Kotton indicated that the precision of quantitative nucleic acid tests to determine viral load are such that changes in values should be at least threefold (0.5 log) to represent biologically important changes.<sup>20</sup> Whatever the extraction protocol and its variable efficiency, the quality of extracts and the normalization of results by measuring the amount of total DNA explored in the real-time PCR permitted to have comparable results of HIV-DNA expressed per million cells between laboratories. The use of different batches of the Generic HIV DNA CELL assay on different thermocyclers did not compromise the results of this inter-laboratory quality control for HIV-1 DNA quantification. No reference assay is available and commercialized for HIV-1 DNA quantification so we could not perform comparison with one gold standard.

In conclusion, the inter-laboratory reproducibility reported here with this quality control is a key step for future applications in multicenter studies and clinical practice. Interestingly we showed the reproducibility of the standardized quantitative total HIV-1 DNA assay developed by the ANRS working group to quantify the HIV-1 DNA load as a marker of HIV reservoir.

#### ACKNOWLEDGMENTS

We thank the QCMD team for preparing the HIV DNA qualitative panel and the ANRS for funding the AC11 working group.

#### CONFLICTS OF INTEREST

The authors have no conflicts of interest.

#### REFERENCES

- Churchill MJ, Deeks SG, Margolis DM, Siliciano RF, Swanstrom R. HIV reservoirs: what, where and how to target them. *Nat Rev Microbiol.* 2016;14:55–60.
- Eriksson S, Graf EH, Dahl V, et al. Comparative analysis of measures of viral reservoirs in HIV-1 eradication studies. *PLoS Pathog.* 2013;9:e1003174.
- Kiselinova M, De Spiegelaere W, Buzon MJ, Malatinkova E, Lichterfeld M, Vandekerckhove L. Integrated and total HIV-1 DNA predict ex vivo viral outgrowth. *PLoS Pathog.* 2016;12:e1005472.
- Avettand-Fènoël V, Hocqueloux L, Ghosn J, et al. Total HIV-1 DNA, a marker of viral reservoir dynamics with clinical implications. *Clin Microbiol Rev.* 2016;29:859–880.
- Beloukas A, Paraskevis D, Haida C, Sypsa V, Hatzakis A. Development and assessment of a multiplex real-time PCR assay for quantification of human immunodeficiency virus type 1 DNA. *J Clin Microbiol.* 2009;47:2194–2199.
- Casabianca A, Gori C, Orlandi C, Forbici F, Federico Perno C, Magnani M. Fast and sensitive quantitative detection of HIV DNA in whole blood leucocytes by SYBR green I real-time PCR assay. *Mol Cell Probes.* 2007;21:368–378.
- Avettand-Fènoël V, Chaix ML, Blanche S, et al. LTR real-time PCR for HIV-1 DNA quantitation in blood cells for early diagnosis in infants born to seropositive mothers treated in HAART area (ANRS CO 01). *J Med Virol.* 2009;81:217–223.
- Strain MC, Lada SM, Luong T, et al. Highly precise measurement of HIV DNA by droplet digital PCR. *PLoS ONE.* 2013;8:e55943.
- De Rossi A, Zanchetta M, Vitone F, et al. Quantitative HIV-1 proviral DNA detection: a multicentre analysis. *New Microbiol.* 2010;33:293–302.
- Luzuriaga K, Tabak B, Garber M, et al. HIV type 1 (HIV-1) proviral reservoirs decay continuously under sustained virologic control in HIV-1-infected children who received early treatment. *J Infect Dis.* 2014;210:1529–1538.
- Persaud D, Patel K, Karalius B, et al. Influence of age at virologic control on peripheral blood human immunodeficiency virus reservoir size and serostatus in perinatally infected adolescents. *JAMA Pediatr.* 2014;168:1138–1146.
- Serrano-Villar S, Sainz T, Ma ZM, et al. Effects of combined CCR5/integrase inhibitors-based regimen on mucosal immunity in HIV-infected patients naïve to antiretroviral therapy: a pilot randomized trial. *PLoS Pathog.* 2016;12:e1005381.
- Avettand-Fènoël V, Prazuck T, Hocqueloux L, et al. HIV-DNA in rectal cells is well correlated with HIV-DNA in blood in different groups of patients, including long-term non-progressors. *AIDS.* 2008;22:1880–1882.
- Cockerham LR, Siliciano JD, Sinclair E, et al. CD4+ and CD8+ T cell activation are associated with HIV DNA in resting CD4+ T cells. *PLoS ONE.* 2014;9:e110731.
- Chun TW, Murray D, Justement JS, et al. Relationship between residual plasma viremia and the size of HIV proviral DNA reservoirs in infected individuals receiving effective antiretroviral therapy. *J Infect Dis.* 2011;204:135–138.
- Darcis G, Kula A, Bouchat S, et al. An in-depth comparison of latency-reversing agent combinations in various in vitro and ex vivo HIV-1 latency models identified bryostatin-1+JQ1 and ingenol-B+JQ1 to potentially reactivate viral gene expression. *PLoS Pathog.* 2015;11:e1005063.
- Descours B, Petitjean G, López-Zaragoza JL, et al. CD32a is a marker of a CD4 T-cell HIV reservoir harbouring replication-competent proviruses. *Nature.* 2017;543:564–567.
- Pasternak AO, Adema KW, Bakker M, et al. Highly sensitive methods based on seminested real-time reverse transcription-PCR for quantitation of human immunodeficiency virus type 1 unspliced and multiply spliced RNA and proviral DNA. *J Clin Microbiol.* 2008;46:2206–2211.
- Hong F, Aga E, Cillo AR, et al. Novel assays for measurement of total cell-associated HIV-1 DNA and RNA. *J Clin Microbiol.* 2016;54:902–911.
- Kotton CN, Kumar D, Caliendo AM, et al. International consensus guidelines on the management of cytomegalovirus in solid organ transplantation. *Transplantation.* 2010;89:779–795.

**How to cite this article:** Gantner P, Mélard A, Damond F, et al. Interlaboratory quality control of total HIV-1 DNA load measurement for multicenter reservoir studies. *J Med Virol.* 2017;89:2047–2050. <https://doi.org/10.1002/jmv.24874>

# Impact des inhibiteurs de l'intégrase sur la constitution et la compartimentalisation du réservoir viral

## Résumé

L'étude de stratégies visant à diminuer la taille du réservoir viral, et notamment l'impact des traitements antirétroviraux, permettront peut-être de s'approcher des objectifs de guérison de l'infection à VIH. Nous avons analysé la dynamique de ce réservoir chez des personnes vivant avec le VIH débutant un traitement comprenant du dolutégravir (TCD) à différents stades de l'infection.

L'étude DRONE a inclus des personnes débutant et répondant à un TCD et suivies pendant 48 semaines. L'ADN-VIH dans les cellules mononucléées du sang périphérique (CMSP), l'ADN-VIH dans les sous-populations lymphocytaires T CD4+ (Effecteur mémoire, TEM; Transitionnel mémoire, TTM; Central mémoire, TCM and Naïf, TN), le séquençage à haut débit de l'ADN-VIH et des marqueurs inflammatoires (CD14s, CD163s, IL-6us and IP-10) ont été analysés.

Au total, 169 participants ont été inclus dans différents groupes: infections aiguës (AI, n=20), infections chroniques (CI, n=21), en succès virologique sous traitement (VS, n=116) et dans un contexte d'échec virologique à l'initiation du TCD (VF, n=12). L'ADN-VIH dans les CMSP et les sous-populations lymphocytaires, et les marqueurs inflammatoires ont diminué sous TCD dans les groupes AI, CI et VF mais pas dans le groupe VS. La diminution la plus prononcée a été observée dans le groupe AI. La diversité génétique du réservoir viral a, quant à elle, été modifiée rapidement après l'initiation du TCD dans tous les groupes.

Un TCD efficace permet une diminution rapide du réservoir viral chez des personnes naïves de traitement mais aussi en cas d'échec virologique. L'effet du dolutégravir sur la latence virale devrait être étudié plus avant.

**Mots clefs :** VIH, Réservoir, Inflammation, ADN-VIH, Diversité génétique, Inhibiteurs de l'intégrase

## Résumé en anglais

Strategies aimed at reducing the latent HIV reservoir size, including combined antiretroviral therapy, may enhance the probability of a possible cure. Here, we assessed the dynamics of HIV reservoir among HIV-infected adults initiating a dolutegravir-based regimen (DBR) at different stages of HIV infection.

The DRONE trial enrolled individuals starting and responding to a DBR on a 48 weeks follow-up. HIV-DNA in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs), HIV-DNA in sorted CD4+ T cell subsets (Effector memory, TEM; Transitional memory, TTM; Central memory, TCM and Naive, TN), HIV-DNA ultra-deep sequencing and serum immune activation biomarkers (sCD14, sCD163, IL-6us and IP-10) were assessed.

Overall, 169 participants were allocated to different groups: acute infections (AI, n=20), chronic infections (CI, n=21), individuals in virological success on treatment (VS, n=116), and in the aftermath of virological failures at baseline (VF, n=12). HIV-DNA in PBMCs and in sorted CD4+ T cell subsets, and immune activation markers decreased on DBR in the AI, CI and VF groups but not in the VS group. Participants from the AI group experienced the most dramatic decline. Genetic diversity of the viral reservoir was also affected shortly after DBR initiation in all groups of individuals.

Successful DBR produced a rapid decline in the viral reservoir in treatment-naïve but also in treatment-failing individuals. More studies on the effect of dolutegravir on viral latency are needed.

**Keywords:** HIV, Reservoir, Immune activation, HIV-DNA, Genetic diversity, Integrase inhibitors