



HAL
open science

ASP, la protéine AntiSens du VIH-1 : étude de ses transcrits et de la réponse anticorps anti-ASP chez le patient

Juliette Savoret

► **To cite this version:**

Juliette Savoret. ASP, la protéine AntiSens du VIH-1 : étude de ses transcrits et de la réponse anticorps anti-ASP chez le patient. Virologie. Université Montpellier, 2019. Français. NNT : 2019MONTT050 . tel-03035392

HAL Id: tel-03035392

<https://theses.hal.science/tel-03035392>

Submitted on 2 Dec 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.

THÈSE POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

En Biologie-Santé

École doctorale Sciences Chimiques et Biologiques pour la Santé

Institut de Recherche en Infectiologie de Montpellier - UMR9004

ASP, la Protéine AntiSens du VIH-1 : Etude de ses transcrits et de la réponse anticorps anti- ASP chez le patient

Présentée par Juliette SAVORET

Le 02 décembre 2019

Sous la direction d'Antoine GROSS

Devant le jury composé de

Ahidjo AYOUBA, DR IRD, IRD UMI 233, INSERM U1175, Montpellier

Arnaud MORIS, DR CNRS, I2BC, UMR 9198 CEA, CNRS, Université Paris Sud

Thomas BOURLET, Pr, Service des Agents Infectieux et d'Hygiène, Hôpital Nord,
CHU de Saint-Etienne

Antoine GROSS, CRCN CNRS, IRIM, UMR 9004 CNRS, Montpellier

Président du jury

Rapporteur

Rapporteur

Directeur de thèse



UNIVERSITÉ
DE MONTPELLIER

***"We need a vaccine against intolerance as much as we need
a vaccine against HIV"***

"An ounce of prevention equals a pound of cure"

Amsterdam AIDS conference 2018

Je tiens en premier lieu à remercier les membres de mon jury de thèse pour avoir accepté d'évaluer mes travaux de thèse. Je remercie particulièrement M. Arnaud Moris et M. Thomas Bourlet pour leur retour extrêmement détaillé sur mon manuscrit, riche en conseils et en suggestions. Je remercie également M. Ahidjo Ayouba pour m'avoir fait l'honneur d'être le Président de mon jury de thèse.

Je remercie les financeurs, et en particulier la Fondation pour la Recherche Médicale, pour m'avoir permis de mener à bien mon projet de thèse. Un merci particulier à Sidaction pour avoir financé ma quatrième année de thèse, et pour m'avoir ainsi donné l'opportunité d'accumuler suffisamment de résultats pour les soumettre pour publication !

Je remercie nos collaborateurs pour m'avoir permis de travailler sur des échantillons de patients, car je sais maintenant la difficulté d'accéder à de tels échantillons. Un merci particulier à Philippe Van de Perre, Jean-Pierre Molès et Edouard Tuillon, dont la collaboration nous a permis d'initier le projet sur les anticorps anti-ASP. Merci également à Olivier Lambotte, qui nous a permis d'effectuer la recherche d'anticorps anti-ASP dans le plasma de patients des cohortes ANRS Codex et ANRS SEROCO. Je remercie également les participants des cohortes ANRS 12174, ANRS Codex et ANRS SEROCO, grâce auxquels le projet sur les anticorps anti-ASP a pu voir le jour.

Je tiens à remercier Jean-Michel Mesnard et Bruno Beaumelle pour m'avoir permis de réaliser ma thèse au sein de leur équipe, et l'ensemble de l'équipe APIR pour m'avoir permis d'effectuer ces quatre années de thèse dans une atmosphère conviviale et bienveillante. Je remercie Christophe, mon collègue ASP-ien qui m'a gentiment concocté de savoureux desserts pour mes anniversaires et autres occasions ! Merci à Charlotte pour son aide et son écoute, et pour avoir déblayé le terrain ASP-ien avant mon arrivée ! Merci à Jean-Marie pour ses conseils avisés ! Merci également aux nouvelles recrues de l'équipe, Abla, Margaux, Julie, Janine, Camille, qui vont contribuer à conserver une bonne ambiance dans l'équipe, je le sais ! Merci en particulier à Margaux, c'était agréable de travailler et de discuter avec toi, et Abla, comment est-ce que je vais me nourrir sans toi ??? Merci à Magali pour sa gentillesse et son efficacité ! Merci à Abla, Julie, Christophe, Margaux et Janine pour m'avoir aidée à préparer mon pot de thèse, vous avez transformé une tâche gargantuesque en quelque chose d'agréable ! Je remercie également Nathalie et Lucile, qui ont fait preuve d'écoute et d'empathie tout au long de ces 4 années.

Antoine, je suis une pudique des compliments, donc j'irai à l'essentiel. Un jour, tu m'as dit : « S'il y a quelque chose de réussi dans cette thèse, c'est bien notre relation ». C'est vrai, pour moi notre relation est une réussite. Je dirais que notre relation était un mélange d'honnêteté, de confiance et de bienveillance mutuelle. D'un point de vue plus professionnel, travailler avec toi m'a permis d'acquérir une grande rigueur scientifique, qui me servira au cours de toute ma carrière, quelle qu'elle soit. J'ai une réelle estime pour toi, et ça va vraiment me manquer de travailler avec toi (du coup pour la pudeur des compliments on repassera).

Merci à l'ensemble du personnel de l'IRIM, je trouve qu'il règne dans cet institut une atmosphère bienveillante, et ça a été très important au cours de ma thèse ! Je remercie l'ensemble des amis du labo, thésards ou non, avec qui j'ai partagé les beer hours (quelle bonne idée Mathilde, je le re-dis, pour moi il y a un avant et un après Mathilde dans cet Institut), des

soirées et des sorties, voire des voyages (Célia, si tu ne t'étais pas reconnue ;)). Merci aux voisins de l'équipe de Laurent Kremer, toujours agréables et prêts à me dépanner lorsque je manquais de matériel (cônes 200 µL non sériles, si vous ne vous étiez pas reconnus ;)). Merci en particulier à Ana-Victoria, pour son écoute et ses conseils. Merci à Zoï, ma coloc des UJC 2017, pour ton entrain et ton énergie communicatifs ! Merci à Pascale et Christine, parce qu'en plus d'être redoutablement efficaces, je sais qu'on peut toujours compter sur votre écoute.

Merci à Malvina et Viet, mes deux compagnons de thèse. On est arrivés ensemble dans ce bureau ~~obscur~~ au bout du couloir, où l'étiquette « stagiaire » était là pour nous rappeler le caractère transitoire de notre contrat !!! On a partagé des rires, des déboires, l'excitation du début de thèse, mais aussi les pics de démotivations transitoires. C'est dommage qu'on n'ait pas partagé l'ultime épreuve rédactionnelle, que l'obtention de divers contrats nous a fait réaliser en décalé... Viet, ça n'a pas toujours été évident entre nous. J'avais ce petit côté fou, et un brin sans gêne il faut le dire, qui ne m'a pas toujours valu tes faveurs. Je suis contente qu'on ait trouvé un équilibre, et qu'on se soit trouvé des centres d'intérêt communs en dehors de la thèse. Malvina, on a partagé tellement de choses. Tu m'as vue rire, pleurer, ~~mesurer ma clé USB~~... Tu m'as soutenue pendant les périodes les moins clémentes, parce que tu savais déjà, dans ton infinie sagesse, que les périodes sombres sont souvent le prélude d'une belle éclaircie. Et c'est ce qui est arrivé.

Ce qui m'amène aux acteurs principaux de cette période de renouveau. Ambre, fidèle au poste, tu m'as tellement aidée avec ta légèreté, ton humour Ambre-sque et ton grain de folie si particulier. Partager par téléphone nos déboires rédactionnels m'a aidée à dédramatiser ! Merci à Benoît, sur qui j'ai également pu compter durant les périodes de creux ! En m'introduisant à ton cercle d'amis, tu m'as permis de débiter de belles relations d'amitié, et en cela je ne te remercierai jamais assez. Merci à Thomas et à Marion, mes deux coups de cœur de l'année 2018 ! Merci à Marion qui m'a écoutée et soutenue jusqu'au bout, et qui a mis à contribution ses talets culinaires pour mon pot de thèse ! Un grand merci à mes trois colocataires avec qui je vis une belle aventure depuis plus d'un an : Annabelle, Léo(pold), et Pauline. La vie avec vous est un savant mélange de convivialité et de rebondissements fantasques ! Notre colocation m'a permis d'évoluer dans une microbulle de bonne humeur, une sorte de cocon réconfortant dans lequel j'ai pu me réfugier durant les périodes les moins clémentes. Merci enfin à Mikael, qui a l'art de me comprendre en un clin d'œil, et qui a cru en moi comme personne avant.

Table des matières

Abbréviations	9
Introduction	21
I. Emergence du Virus de l'ImmunoDéficiency Humaine : des origines à la pandémie actuelle	22
1. De la découverte du VIH aux enjeux actuels sur le VIH/SIDA	22
a. Historique de la découverte	22
b. Chiffres et enjeux actuels	23
2. Origine et diversité génétique du VIH	27
a. Taxonomie du VIH	27
b. Origine simienne des VIH-1 et -2.....	29
c. Phylogénie du VIH-1	31
d. Diversité génétique du groupe M	32
3. Mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans l'infection par le VIH-1	36
a. Structure et organisation génomique du VIH-1	36
b. Les protéines Gag, Pol et Env du VIH-1	38
c. Les protéines régulatrices du VIH-1	41
d. Les protéines auxiliaires du VIH-1 et les facteurs de restriction cellulaires.....	43
e. Cycle viral et réplication	51
4. Le VIH-1 du groupe M : quels facteurs sont associés à sa propagation pandémique ?.....	55
a. Facteurs épidémiologiques et socio-démographiques	56
b. Facteurs moléculaires intrinsèques au groupe M	57
II. Immunopathologie de l'infection par le VIH-1.....	61
1. Histoire naturelle de l'infection par le VIH-1.....	61
a. Tropisme et cibles cellulaires du VIH-1	61
b. Les différents stades cliniques de l'infection par le VIH-1	65
c. Etablissement de réservoirs latents au cours de l'infection	66
2. Impact de l'infection par le VIH-1 sur le système immunitaire de l'hôte	69
a. Déplétion massive des TCD4+ (lymphopénie).....	69

b.	Activation chronique du système immunitaire	69
c.	Dérégulation du système immunitaire.....	70
d.	Marqueurs de la progression de la pathologie	71
3.	Réponse immunitaire adaptative de l'hôte induite par le VIH-1	73
a.	Réponse humorale dirigée contre le VIH-1	73
b.	Réponse T CD8+ cytotoxique dirigée contre le VIH-1	83
c.	Patients qui contrôlent spontanément la réplication virale	86
4.	Brève description des traitements actuels et thérapies émergentes	88
a.	Traitements actuels	88
b.	Les essais vaccinaux.....	90
c.	Les stratégies d'éradication des réservoirs	91
III.	ASP, la Protéine AntiSens du VIH-1 : étude du gène <i>asp</i> , des transcrits associés et de la protéine	93
1.	Gène antisens et activité transcriptionnelle associée chez les rétrovirus	93
a.	Considérations générales sur les gènes antisens	93
b.	Activité transcriptionnelle antisens chez les rétrovirus	96
2.	ASP : de la découverte du gène aux fonctions potentielles	100
a.	Découverte et conservation du gène <i>asp</i>	100
b.	Le promoteur et les transcrits antisens associés à <i>asp</i>	102
c.	ASP : tour d'horizon des connaissances actuelles.....	105
	Présentation du projet	116
I.	Contexte scientifique global autour d'ASP et bref état des lieux des projets et des contrats actuels de l'équipe sur ASP	117
II.	Les potentiels apports en connaissances fondamentales sur ASP de mon projet de thèse	118
III.	Les potentielles retombées cliniques de mon projet de thèse	119
IV.	Techniques utilisées pour mener à bien le projet et plan des résultats	120
	Résultats	121
I.	Caractérisation de la réponse anticorps dirigée contre ASP chez le patient	122
1.	Développement d'une technique permettant de détecter les anticorps dirigés contre ASP dans des échantillons de patients	123
a.	Principe de la technique LIPS et choix de l'antigène.....	123
b.	Test du LIPS avec un anticorps monoclonal dirigé contre ASP.....	125
2.	Recherche d'anticorps anti-ASP dans les échantillons biologiques de patients infectés par le VIH-1.....	127

a.	Détection d'anticorps anti-ASP dans le plasma et le lait maternel de patientes non traitées originaires du Burkina Faso	127
b.	Recherche d'anticorps anti-ASP dans le plasma de patients français sous ART	137
c.	Recherche d'anticorps anti-ASP dans le plasma de patients progressseurs et naïfs de tout traitement	139
d.	Recherche d'anticorps anti-ASP dans le plasma de patients qui contrôlent spontanément la réplication virale.....	142
3.	Dynamique de la réponse anticorps anti-ASP chez les patients #7, #9, #16 et #40	145
a.	Dynamique de la réponse anticorps anti-ASP des patients #7, #9 et #16 du Burkina Faso	145
b.	Dynamique de la réponse anticorps anti-ASP du patient #40 de la cohorte SEROCO	148
4.	Analyse de l'épitope d'ASP ciblé par les anticorps des patients #7, #9, #16 et #40	151
II.	Etude de l'expression du transcrit d' <i>asp</i> dans des cellules de patients infectés par le VIH-1	157
1.	Développement d'une technique de RT-qPCR brin-spécifique pour détecter les transcrits d' <i>asp</i>	157
a.	Principe de la technique de RT-qPCR brin-spécifique	157
b.	Validation des amorces de RT-qPCR d' <i>asp</i> utilisées.....	159
2.	Détection des transcrits d' <i>asp</i> dans des lignées cellulaires infectées de manière latente.....	162
3.	Détection des transcrits d' <i>asp</i> dans les cellules de patients infectés par le VIH-1	164
	Discussion	168
I.	Détection des transcrit d' <i>asp</i> chez le patient.....	169
II.	Détection d'anticorps anti-ASP chez le patient.....	171
1.	Fréquence de patients présentant des anticorps anti-ASP	171
2.	Epitope d'ASP ciblé par les anticorps <i>in vivo</i>	173
3.	Profil d'expression d'ASP au cours de l'infection	174
4.	Réponse anticorps anti-ASP et CV plasmatique	176
5.	Réponse anticorps anti-ASP dans le lait maternel	178
	Conclusion et Perspectives	180
	Matériel et Méthodes	185
I.	Culture cellulaire	186
1.	Lignées cellulaires.....	186
a.	Cellules eucaryotes et transfections	186
b.	Cellules procaryotes et transformation.....	186
2.	Cellules primaires	187
II.	Biologie moléculaire.....	188

1.	Génération des séquences codantes de la nanoluciférase, de nano-ASP et des mutants nano- Δ ASP	188
a.	Choix des séquences nucléotidiques à utiliser	188
b.	Mutants de nano-ASP générés	188
c.	Génération des constructions p-CAG-nano, -nano-ASP et -nano- Δ ASP par clonage	189
2.	RT-qPCR brin spécifique (voir partie II1a des résultats)	195
a.	Amorces de RT et de qPCR	195
b.	Extraction d'ARN et réaction de réverse transcription (RT)	197
c.	Réaction de qPCR	198
d.	Gamme étalon et analyse des résultats (voir partie II1a des résultats)	199
III.	Immuno-assays	200
1.	Western-blot	200
2.	Luciferase Immunoprécipitation System (LIPS)	201
a.	Récolte et préparation des lysats cellulaires	202
b.	Origine, isolation et préparation des échantillons de plasma et de lait maternel	203
c.	Réalisation du LIPS	205
d.	Test du LIPS avec un anticorps monoclonal anti-ASP	206
e.	Normalisation des signaux luminescents par rapport à une gamme étalon anti-Flag	207
f.	Normalisation des signaux obtenus pour les mutants nano- Δ ASP	209
IV.	Description des cohortes de patients et considérations éthiques	210
	Références	212

Table des illustrations et des tableaux

Figure 1: Estimation du nombre d'individus vivant avec le VIH dans le monde.	24
Figure 2 : Phylogénie et structure générale des Rétrovirus.	28
Figure 3 : Diversité génétique des différentes lignées de VIS et de VIH.	30
Figure 4 : Mécanismes à l'origine de la diversité génétique du groupe M.	34
Figure 5 : Répartition mondiale des principaux sous-types et CRF du groupe M du VIH-1 entre 2010 et 2015.	36
Figure 6 : Structure de la particule virale et organisation génomique du VIH-1.	37
Figure 7 : Principaux domaines des polyprotéines Pr55 Gag, Pr160 Gag-Pol et Env.	39
Figure 8 : Fonctions associées aux protéines régulatrices du VIH-1.	42
Figure 9 : Localisation génomique des gènes codant pour les protéines auxiliaires du VIH-1 et principales fonctions de ces protéines.	45
Figure 10 : Acteurs cellulaires et viraux des phases précoces et tardives du cycle viral du VIH-1.	52
Figure 11: Historique de la propagation pandémique du groupe M du VIH-1.	57
Figure 12 : L'usage des corécepteurs du VIH-1 (CCR5/CXCR4) défini ses principales cibles cellulaires.	62
Figure 13 : Evolution de la charge virale plasmatique, du taux de T CD4+ et d'anticorps spécifiques du VIH-1 au cours des trois phases naturelles de l'infection par le VIH-1.	66
Figure 14 : Principaux processus impliqués dans l'activation immunitaire chronique observée chez les individus infectés par le VIH-1.	70
Figure 15: Structure des principaux isotypes d'immunoglobulines et fonctions associées.	74
Figure 16: Principales étapes du développement d'un lymphocyte B dans les organes lymphoïdes secondaires.	77

Figure 17 : Les protéines Gag, Env, Pol et les protéines auxiliaires du VIH-1 élicitent une réponse anticorps chez le patient.	80
Figure 18 : Les anticorps de la mère sont transférés au nouveau-né via le lait maternel.	83
Figure 19 : Les peptides viraux issus de la traduction des 6 cadres de lecture des génomes proviraux intacts et défectueux du VIH-1 induisent potentiellement une réponse T CD8+ cytotoxique.	86
Figure 20: Fenêtre temporelle optimale pour initier l'ART chez les patients	89
Figure 21 : La notion de gène antisens est relative et rendue possible par la propriété du code génétique.....	94
Figure 22 : Les LTR du HTLV-1 et du VIH-1 sont bidirectionnels et initient les transcriptions sens et antisens à chaque extrémité du génome proviral.	98
Figure 23 : Le gène <i>asp</i> est exclusivement conservé au sein du groupe pandémique M du VIH-1. ...	101
Figure 24 : Principaux transcrits d' <i>asp</i> caractérisés <i>in vitro</i>	103
Figure 25 : Structure primaire d'ASP, la Protéine Antisens du VIH-1.....	106
Figure 26 : Alignement des séquences protéiques consensus d'ASP des principaux sous-types et CRF du groupe M du VIH-1 présentant l'ORF d'ASP.....	107
Figure 27 : Différentes localisations subcellulaires décrites pour ASP et hypothèses sur les fonctions potentielles des différentes formes d'ASP dans la cellule.	111
Figure 28 : Développement de la technique LIPS (<i>Luciferase Immunoprecipitation System</i>) pour détecter des anticorps anti-ASP dans les échantillons biologiques de patients infectés par le VIH-1.	124
Figure 29 : Immuno-précipitation spécifique de nano-ASP par un anticorps monoclonal anti-ASP et détermination du bruit de fond associé à nano-ASP dans le plasma.....	126
Figure 30 : Protocole de la prise d'ARV et suivi des patientes incluses dans l'étude clinique PROMISE-PEP.....	128
Figure 31 : Détection d'anticorps anti-ASP dans le plasma des 19 patientes du Burkina Faso à S37.	131
Figure 32: Détermination du titre d'anticorps anti-ASP dans le plasma des patientes #7, #9 et #16 à S37.....	132
Figure 33 : Recherche d'anticorps anti-ASP dans le lactosérum et le plasma des patientes #1, #7, #9 et #16 à S0.	134
Figure 34: Recherche d'anticorps anti-ASP dans le lactosérum et le plasma des patientes #7, #9 et #16 à S37.	136
Figure 35 : Les patients sous ART ne présentent pas d'anticorps anti-ASP.	138
Figure 36 : Un des 10 patients de la cohorte SEROCO présente des anticorps anti-ASP plasmatiques avant initiation de l'ART	141

Figure 37 : Les 20 patients qui contrôlent spontanément la réplication virale ne présentent pas d'anticorps anti-ASP.	145
Figure 38 : Suivi de la réponse anticorps anti-ASP, de la CV et du taux de T CD4+ à différents temps après arrêt de l'ARV chez les patientes #7, #9 et #16.	148
Figure 39 : Suivi de la réponse anticorps anti-ASP, de la CV et du taux de T CD4+ à différents temps post-inclusion chez le patient #40.	150
Figure 40 : Génération de mutants d'ASP pour déterminer l'épitope d'ASP ciblé <i>in vivo</i>	153
Figure 41 : Contribution des différents domaines d'ASP à l'épitope ciblé par les anticorps des patients #7, #9, #16 et #40.	154
Figure 42 : Principe général de la technique de RT-qPCR brin-spécifique.	158
Figure 43 : Développement de la technique de RT-qPCR brin-spécifique pour la détection des transcrits d' <i>asp</i> dans des cellules infectées par le VIH-1	160
Figure 44 : Analyse de l'expression du transcrit d' <i>asp</i> dans deux lignées cellulaires infectées de manière latente, avant ou après traitement avec des activateurs de la voie NF-kB.	163
Figure 45 Des transcrits d' <i>asp</i> sont détectés dans les T CD4+ totaux des patients #34 et #35.	165
Figure 46 : Les deux approches envisagées pour améliorer la détection qualitative et quantitative des anticorps anti-ASP chez les patients.	183
Figure 47 : Représentation schématique des différentes formes mutantes d'ASP (Δ ASP) fusionnées à la nanoluciférase (nano).	189
Figure 48 : Génération des séquences codantes nano-ASP, nano-ASP 26-189 et nano-ASP 60-189 par PCR chevauchante.	194
Figure 49: Comparaison de l'intensité du signal luminescent obtenu avec les protéines nanoluciférase (Nluc), <i>renilla</i> luciférase (Rluc) et <i>firefly</i> luciférase (Fluc) après ajout du substrat furimazine (Nluc) ou coelentérazine (Rluc et Fluc).	202
Figure 50 : Epitope d'ASP reconnu par l'anticorps monoclonal anti-ASP.	207
Figure 51 : Droite étalon de la gamme de l'anticorps anti-Flag utilisée comme standard externe.	208
Figure 52 : Bruit de fond luminescent associé à la forme entière de nano-ASP et aux différents mutants nano- Δ ASP.	209

Table 1 : description des paramètres immuno-virologiques des 19 patientes originaires du Burkina-Faso de la cohorte ANRS 12174 à S0 et à S37.....	129
Table 2 : Caractéristiques Immuno-virologiques des groupes de patientes du Burkina Faso dont la charge virale était détectable (groupe DET) ou indétectable (groupe IND) à l'arrêt de la prise d'ARV.	130
Table 3 : Description des paramètres immuno-virologiques des 10 patients de la cohorte ANRS SEROCO aux deux temps post-inclusion étudiés (pré-ART et post-ART).....	140
Table 4 : Description des paramètres immuno-virologiques des 20 patients de la cohorte ANRS CODEX aux deux temps post-inclusion étudiés.....	144
Table 5 : Description des paramètres immuno-virologiques des patientes #7, #9 et #16 à différents temps après l'arrêt de la prise d'ARV.....	146
Table 6 : Description des paramètres immunologiques et virologiques du patient #40 de la cohorte SEROCO à différents temps post-inclusion pré-ART et post-ART.....	149

Abbreviations

A

ACH-2: A3.01 clone H-2

ADCC: Antibody-dependent Cell-mediated cytotoxicity

ADCP: Antibody Dependent Cell Phagocytosis

ADN: Acide DésoxyriboNucléique

AID: Activation-induced Cytidine Deaminase

ALV: Avian Leukosis Virus

ANRS : Agence Nationale de Recherche sur le Sida et les hépatites virales

AP-1: Activator Protein 1

APOBEC: Apolipoprotein B mRNA Editing enzyme, Catalytic polypeptide-like

APH-2, 3 et 4: Antisense Protein of HTLV-1, 2, 3 and 4

APS: Ammonium Persulfate

ARF: Alternative Reading Frame

ARN: Acide RiboNucléique

ARN Inc: ARN long non codant

ARNm: ARN messenger

ARN PIWI: ARN P-element Induced WImpy testis in Drosophila

ARNt: ARN de transfert

ART: Antiretroviral Therapy

ARV: AntiRetroViral drug

ASP: Antisense Protein (Protéine Antisens)

ASPOpt : ASP optimisée

ASPwt : ASP wild type (sauvage)

ATL: Adult-T cell-Leukemia

ATP: Adenosine Triphosphate

ATR: Ataxia-Telangiectasia and Rad3-related

AZT: Azidothymidine

B

BCR: B Cell Receptor

BIV: Bovine Immunodeficiency Virus

BLV: Bovine Leukemia Virus

bNAb: broadly Neutralizing Antibodies

BST-2: Bone marrow Stromal antigen 2

bZip: basic leucine Zipper

C

C: celsius

C1-C5: régions Constantes 1-5

CA: Capside

CCR5/7: C-C Chemokine Récepteur type 5/7

CD 3/4/8/14/28/38: Cluster of Differentiation 3/4/8/14/28/38

CDC: Complement-Dependent Cytotoxicity

CDK9: Cycline Dependant Kinase 9

CE: Cryptic Epitope

CEA: Commissariat à l'énergie atomique et aux énergies alternatives

CESP: Centre de Recherche en Epidémiologie et Santé des Populations

CHU: Centre Hospitalo-Universitaire

CMH: Complexe Majeur d'Histocompatibilité

CMV: Cytomegalovirus

CNRS: Centre Nationale de la Recherche Scientifique

COS7: CV-1 (simian) in Origin, and carrying the SV40 genetic material

CREB: cAMP response element-binding protein

CRF: Circulating Recombinant Form

CRM-1: Chromosomal Maintenance 1

Ct: Cycle threshold

CTL: Cytotoxic T lymphocyte

CTLA-4: Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated protein 4

CV: Charge Virale

CXCR4: C-X-C Chemokine Receptor type 4

D

DC: Dendritic Cell

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

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium

dNTP: deoxyNucleotide Triphosphate

DTT: Dithiothreitol

E

EC: Elite Controller

EcoRI : Escherichia coli RI

Env: Enveloppe

EDTA: 1,2-Diaminocyclohexane-N,N,N',N' - Tetraacetic Acid

EFS: Etablissement Français du Sang

ELISA: Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay

ESCRT: Endosomal Sorting Complex Required for Transport

F

Fc: Fragment cristallisable

FcR: Récepteur aux Fragments Fc

FDC: Follicular Dendritic Cell

FIV: Feline Immunodeficiency Virus

FE : Forme entière

FR: Facteur de Restriction

G

G2: Gap 2

Gag: Group of antigens

GALT: Gut Associated Lymphoid Tissue

Gp 41: Glycoprotéine 41

Gp 120: Glycoprotéine 120

GPI: Glycosylphosphatidylinositol

H

h: heure

HAM/TSP: HTLV-1-Associated Myelopathy/Tropical Spastic Paraparesis

HBZ: Human b-Zip factor

HCl: Hydrogen Chloride

HEK 293T: Human Embryonic Kidney expressing the SV40 large T antigen

HLA: Human Leucocyte Antigen

HLA-DR: Human Leucocyte Antigen – antigen D Related

HPRT: Hypoxanthine-guanine Phosphoribosyltransferase

HRP: Horseradish Peroxidase

HUSH: Human Silencing Hub

HTLV-1: Human T-cell Leukemia Virus 1

I

ICTV: International Committee Taxonomy on Viruses

IFI16: Gamma-Interferon-Inducible protein 16

IFN: Interféron

IFITM : Interferon-Induced Transmembrane

IkB: Inhibiteur de NF-kB

Ig: Immunoglobuline

IL-2: Interleukine 2

IL-10: Interleukine 10

ILT7: Immunoglobulin-Like Transcript 7

IMVA: Immunologie des Infections Virales et des maladies Auto-immunes

IN: Intégrase

INSB: Institut des Sciences Biologiques du CNRS

INSERM: Institut national de la Santé et de la Recherche Médicale

IRF3: Interferon Regulatory Factor 3

IRIM: Institut de Recherche en Infectiologie de Montpellier

IT: Interférence Transcriptionnelle

L

LAV: Lymphadenopathy-Associated Virus

LB: Luria Broth

LC3: Microtubule-associated protein 1A/1B-Light Chain 3

LIRMM: Laboratoire d'Informatique, de Robotique et de Microélectronique de Montpellier

LIPS: Luciferase Immunoprécipitation System

LMV: Lamivudine

LNTP: Long Term Non Progressor

LPS: Lipopolysaccharide

LRA: Latency Reversing Agent

LTR: Long Terminal Repeat

LU: Light Unit

M

M: Mitose

MA: Matrice

Mab: Monoclonal antibody

MAGIC-5A: CCR5-expressing HeLa/CD4⁺ cell clone 1-10

MALT: Mucosal Associated Lymphoid Tissue

MARCH: Membrane Associated RING-CH

MgCl₂: Magnesium Chloride

mi ARN: micro ARN

μL: microliter

MLV: Murine Leukemia Virus

min: minute

MIP1 α/β : Macrophage Inflammatory Protein 1 α/β

mL: millilitre

MPER: Membrane Proximal External Region

MRCA: More Recent Common Ancestor

MX-2: Myxovirus resistance 2

N

NAT: Natural Antisense Transcripts

NaCl: Sodium Chloride

Nano: Nanoluciférase

NC: Nucléocapside

ND: Non Disponible

Nef: Negative factor

NFAT: Nuclear factor of activated T-cells

NF- κ B: Nuclear Factor-kappa B

NK: Natural killer

NLS: Nuclear Localization Sequence

NTB-A: NK-, T- and B-cell Antigen

O

OMS: Organisation Mondiale de la Santé

ORF: Open Reading Frame

P

PBMC: Peripheral Blood Mononuclear Cells

PBS : Phosphate Buffer saline

PBS : primer Binding Site

PCCI : Pathogénèse et Contrôle des Infections Chroniques

PCR: Polymerase Chain Reaction

PD-1: Programmed cell-Death protein 1

pDC: plasmacytoid Dendritic Cell

PEI: Polyethylenimine

PIC: Pre-integration Complex

PIP2: Phosphatidylinositol (4,5) bisphosphate

PMA : Phorbol 12-Myristate 13-Acetate

PNH: Primates Non Humains

Pol: Polymérase

PPT : Polypurine Tract

PTC: Post-treatment Controller

PR : Protéase

PRC2: Polycomb Repressor Complex 2

PrEP: Pre-Exposure Prophylaxis

PTAP: Pro-Thr/Ser-Ala-Pro

PVDF: Polyvinylidene Difluoride

PxxP: domaine riche en prolines

Q

qPCR: PCR quantitative

R

RAG-1/2: Recombination Activating Genes 1 and 2

RDC: République Démocratique du Congo

RLU: Relative Light Unit

RNase H: Ribonucléase H

rpm: rotation par minute

RPL19: Ribosomal Protein L19

RPMI: Roswell Park Memorial Institute

RRE: Rev Responsive Element

RT: Réverse Transcription

RTC: Retro-Transcription Complex

RT-PCR: Réverse Transcription Polymerase Chain Reaction

S

s: seconde

S0 / S13 / S25 / S37: Semaine 0 / 13 / 25 / 37

SAMHD1: SAM domain and HD domain-containing protein 1

SDS-PAGE: Sodium dodecyl Sulfate- Polyacrylamide Gel Electrophoresis

SERINC 3 / 5: Serine Incorporator 3 / 5
SH3: Src Homology region 3
SIDA: Syndrôme de l'Immunodéficience Acquise
siARN: small interfering ARN
SLX4: Structure-specific endonuclease subunit SLX4
SOC: Super Optimal Broth
SP1: Specificity Protein 1
SP1/SP2: Spacer Peptide 1/2
STLV-1: Simian T cell Lymphotropic Virus type 1
SVF: Serum de Veau Fœtal

T

Taq: *Thermophilus aquaticus*
TasP: Treatment as Prevention
Tat: Transactivator of transcription
TAR: Tat Responsive Element
T CD4⁺: lymphocyte T CD4⁺
TCR: T Cell Receptor
TEFb: Transcription Elongation Factor b
TEMED: Tetramethylethylenediamine
TFIIB: Transcription Factor II B
TNF- α : Tumor Necrosis factor α
TGF- β : transforming Growth Factor β
TI: Transcriptase Inverse
Tim-3: T-cell immunoglobulin and mucin-domain containing-3
Tm: melting Temperature
TM1/2: domaine Transmembranaire $\frac{1}{2}$

TPE : Traitement Post-Exposition

TPI: Temps Post-Inclusion

TRAIL: TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand

Treg: Lymphocyte T régulateur

TREX1: Transcription Export Complex 1

TRIM: Tripartite Motif

TSS: Transcription Starting Site

V

V1-V5: régions Variables 4-5

Vif: Viral infectivity factor

VIH: Virus de l'Immunodéficience Humaine

VIS: Virus de l'Immunodéficience Simienne

VIS cpz: VIS de Chimpanzé

VIS den : VIS de *dent's Mona monkey*

VIS gor: VIS de Gorille

VIS gsn : VIS de *great spot-nosed monkeys*

VIS mon : VIS de *Mona monkeys*

VIS mus : VIS de *mustached monkeys*

VIS rcm: VIS de *red-capped mangabey*

VIS sm: VIS de *sooty mangabey*

Vpr: Viral protein r

VPS4: Vacuolar Protein Sorting-associated protein 4

Vpu: Viral protein u

Vpx: Viral protein x

W

WT: Wild Type

U

U1: HIV-1 infected U937

UMR : Unité Mixte de Recherche

URF: Unique Recombinant Form

Z

ZDV: Zidovudine

Introduction

I. Emergence du Virus de l'ImmunoDéficiency Humaine : des origines à la pandémie actuelle

1. De la découverte du VIH aux enjeux actuels sur le VIH/SIDA

a. Historique de la découverte

C'est en 1981 qu'apparaissent les premiers signes alarmants d'une épidémie émergente. En effet, cette même année, le *Centers Disease Control* d'Atlanta reporte cinq cas de patients à orientation homosexuelle atteints d'une forme grave de pneumonie (Centers for Disease Control (CDC) 1981). Les 15 jours suivants, 31 nouveaux cas identiques sont rapportés. Cette maladie, qui semble alors provoquer une immunodéficiency uniquement chez les hommes à orientation homosexuelle, est dans un premier temps nommée GRID pour *Gay-Related Immune Deficiency*. A la fin de l'année 1981, il devient évident que cette maladie sévit également chez les utilisateurs de drogues injectables et chez les personnes transfusées. La maladie est alors renommée **AIDS pour *Acquired Immunodeficiency Syndrom*** (SIDA en français pour Syndrome de l'ImmunoDéficiency Humaine) en 1982 (Centers for Disease Control (CDC) 1982). Il est important de noter que ces premiers cas à l'origine de la découverte de la maladie sont à l'origine de la stigmatisation dont souffrent encore aujourd'hui certaines populations dites "à risque".

Dès 1982, le SIDA dépasse les frontières américaines et les scientifiques se mobilisent dans le monde entier pour identifier l'agent étiologique de cette maladie. Parallèlement, les premiers cas de SIDA sont relatés en Afrique cette même année, et la maladie est observée en France chez des patients hémophiles transfusés. Deux ans auparavant, le virus HTLV-1 (*Human T-cell Leukemia Virus I*) avait été isolé de patients souffrant de leucémies et de lymphomes T humains (Poiesz et al. 1980). Ces différents éléments ont amené les scientifiques à avancer une hypothèse rétrovirale pour la nature de l'agent infectieux à l'origine du SIDA.

En 1983, les Professeurs Françoise Barré-Sinoussi et Luc Montagnier isolent pour la première fois l'agent infectieux à l'origine du SIDA. Ils détectent l'existence d'une activité transcriptase inverse dans le surnageant de culture des cellules ganglionnaires d'un patient atteint de lymphadénopathie (patient BRU). La mise en évidence d'une activité transcriptase inverse, qui est une activité enzymatique propre aux rétrovirus, apporte alors une preuve irréfutable de la nature rétrovirale de l'agent causal du SIDA. L'observation de ces cellules en culture révèle également une autre propriété de l'agent infectieux à l'origine du SIDA, qui le

distingue alors parfaitement du rétrovirus HTLV-1 isolé par le Dr. Robert Gallo en 1980. En effet, contrairement au HTLV-1 qui induit une prolifération des cellules en culture, l'agent causal du SIDA exerce une action cytopathogène sur les cellules en culture. Enfin, l'observation au microscope électronique de l'agent infectieux à l'origine du SIDA démontre une morphologie caractéristique des rétrovirus, mais différente de celle du HTLV-1. Le virus à l'origine du SIDA fut dès lors nommé LAV, pour *Lymphadenopathy-Associated Virus*. Le 20 mai 1983, une publication provenant du laboratoire du Pr. Montagnier et relatant la découverte de LAV paraît dans la revue Science (Barré-Sinoussi et al. 1983). En 1984, l'équipe américaine concurrente du Dr. Robert Gallo publie dans ce même journal la découverte d'un rétrovirus lymphotrope isolé de deux patients atteints du SIDA, qu'il nomme HTLV-III (Zagury et al. 1984). Les virus LAV et HTLV-III, qui s'avèrent par la suite être deux isolats du même virus (Ratner et al. 1985), sont nommés **VIH pour Virus de l'Immunodéficience Humaine** en 1986. Cette même année, un rétrovirus possédant des caractéristiques biologiques et morphologiques très similaires au VIH est isolé de deux patients atteints du SIDA en Afrique de l'Ouest (Clavel et al. 1986). Cette découverte mène à la distinction de deux types de VIH : le **VIH-1** (anciennement LAV et HTLV-III) et le **VIH-2** décrit par Clavel et al.

Sauf précision de ma part, je ferai uniquement référence au VIH-1 dans la suite de ma thèse.

b. Chiffres et enjeux actuels

Le SIDA reste « la plus grande catastrophe sanitaire du XXe siècle », d'après l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS). Plus de trente ans après sa découverte, le VIH a atteint même les régions du monde les plus reculées et l'épidémie du SIDA est devenue pandémique. La difficulté à élaborer un vaccin préventif et les enjeux socio-économiques qu'elle soulève font de la thématique VIH/SIDA une problématique pluridisciplinaire qui requiert l'expertise combinée de plusieurs champs de recherche scientifique : les recherches fondamentale, clinique, épidémiologique, sociale et communautaire.

Repères épidémiologiques (ONUSIDA: 'Ending AIDS: Progress towards the 90-90-90 targets')

Depuis le début de l'épidémie, plus de **70 millions** de personnes ont été infectées par le VIH à travers le monde, et **35 millions** de personnes sont décédées des suites de l'infection par le VIH. A l'heure actuelle, environ **37 millions** de personnes sont infectées par le VIH dans le

monde. L’Afrique de l’Est et l’Afrique du Sud restent les régions les plus sévèrement touchées par la pandémie, et concentrent à elles seules 19.4 millions de personnes infectées dans le monde (Figure 1). Le nombre de nouvelles infections parmi les adultes de 15-45 ans a en moyenne reculé de 16% dans le monde entre 2010 et 2016. Ce chiffre encourageant masque cependant d’importantes disparités, notamment en **Europe Occidentale et en Asie de l’Est**, où l’absence de politique de prévention, la stigmatisation et la criminalisation de pratiques à risque constituent le principal moteur de l’épidémie.

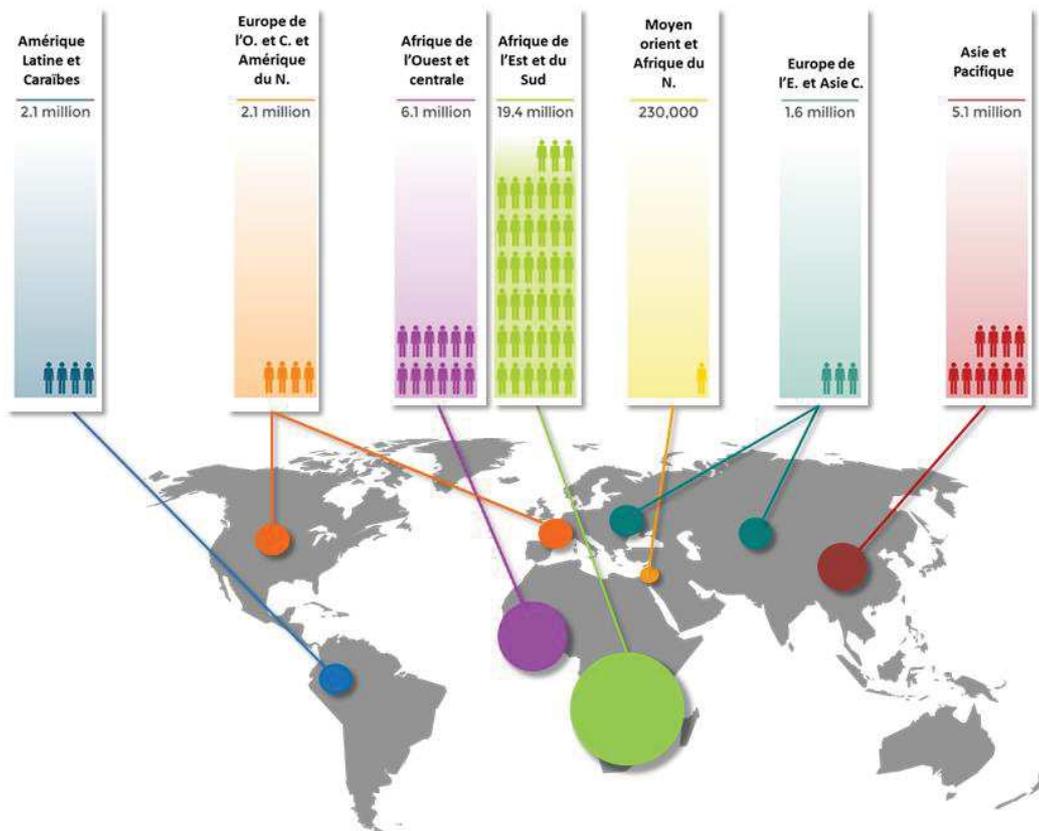


Figure 1: Estimation du nombre d'individus vivant avec le VIH dans le monde. Source : Données 2017 ONUSIDA.

En 2013, l’ONUSIDA a lancé l’**objectif 90-90-90** visant à ce que, à l’horizon de 2020 :

- ✓ 90% des personnes infectées par le VIH connaissent leur **statut sérologique**.
- ✓ 90% des personnes dépistées reçoivent un **traitement durable**.
- ✓ 90% des personnes traitées aient une **charge virale durablement supprimée**.

La 22^e conférence mondiale sur le VIH/SIDA qui a eu lieu à Amsterdam en 2018 (AIDS 2018) a révélé les chiffres suivants : à l'heure actuelle, dans le monde, **53%** des personnes vivant avec le VIH connaissent leur séropositivité, **75%** de ces personnes sont sous traitement, et **77%** des personnes sous traitement ont une charge virale indétectable. Près de la moitié des personnes infectées dans le monde ignorent donc leur séropositivité. Ce chiffre, associé à l'estimation d'1.8 millions de nouvelles infections dans le monde en 2017, souligne l'importance d'**intensifier le rythme actuel des initiatives de prévention** pour atteindre l'objectif 90-90-90 à l'horizon de 2020.

L'importance des différentes voies de transmission du VIH dans la pandémie actuelle

La transmission du VIH d'un individu à l'autre nécessite trois conditions : (i) un vecteur (fluide corporel) contenant le virus, (ii) la présence de virus en concentration suffisante pour que la transmission soit efficace et (iii) une "porte d'entrée" du virus dans l'organisme (plaie, piqûre...). Il existe trois voies de transmission du VIH :

- **Transmission par voie sexuelle.** Le VIH est transmis des fluides sexuels (sperme, liquide pré-séminal, sécrétions vaginales) aux surfaces muqueuses (anales, vaginales, buccales) lors de rapports sexuels anaux, vaginaux ou oraux non protégés. La transmission par voie sexuelle est l'un des principaux moteurs de l'épidémie actuelle, et fait l'objet d'une intensification des politiques de prévention dans l'ensemble du monde. Afin de prévenir les événements de transmission du VIH par voie sexuelle, les principales démarches de prévention employées, souvent utilisées en association, sont :
 - L'usage du **préservatif masculin ou féminin** au cours des rapports sexuels homosexuels et hétérosexuels, oraux et génitaux.
 - **L'utilisation d'antirétroviraux pour la prévention**
 - Le **TasP** (*Treatment as Prevention*). Cette approche consiste à traiter les personnes séropositives afin de prévenir de nouvelles infections, notamment entre partenaires sexuels sérodiscordants (Beyrer et al. 2015). En effet, des études ont rapporté que les personnes sous traitement antirétroviral dont la charge virale est durablement supprimée ont un risque quasiment nul de transmettre le virus à leur partenaire sexuel non infecté (Consolidated guidelines on the use of antiretroviral drugs for treating and preventing HIV infection, WHO 2016).

- La **PrEP** (*Pre-Exposure Prophylaxis*), qui consiste à administrer un traitement antirétroviral préventif aux personnes séronégatives présentant des comportements à risque (Grant et al. 2010; Delaugerre et al. 2017).
 - Le **TPE** (Traitement Post-Exposition), qui consiste à administrer un traitement antirétroviral prophylactique aux individus suivant une exposition au VIH. Le TPE est administré sur une durée de 28 jours et doit être administré dans les 72h suivant la prise de risque.
- **Transmission mère-enfant.** Le VIH peut être transmis de la mère à l'enfant de trois manières différentes : (i) durant la grossesse (**antepartum**), (ii) au cours du travail et de la délivrance (**intrapartum**) et (iii) lors de l'allaitement (**postpartum**). En l'absence de traitement durant la grossesse et la délivrance, 30 à 40% des femmes transmettent le VIH à leur nouveau-né. Ce faible taux de transmission naturelle a été attribué à la présence de facteurs protecteurs dans le lait maternel, et en particulier à la forte concentration en anticorps présents dans le lait maternel (Hanson et al. 2003; Breastfeeding and HIV International Transmission Study Group et al. 2004; Van de Perre et al. 2012). Deux approches existent pour endiguer la transmission du virus de la mère à l'enfant via le lait maternel : le traitement des mères allaitantes infectées (2nd edition. Geneva: World Health Organization 2016), et la prophylaxie antirétrovirale des nouveau-nés non-infectés (World Health Organization 2017). Si les avancées des dernières années dans le traitement prophylactique des mères et des nouveau-nés ont diminué le taux de transmission périnatale du VIH dans le monde, la transmission du virus via le lait maternel reste un enjeu sanitaire majeur.
- **Transmission par le sang.** Le VIH peut être transmis par voie sanguine (i) lors de l'utilisation de matériel d'injection contaminé ou (ii) lors de la transfusion de sang contaminé. Dans les années 1970 et 1980, des milliers de personnes hémophiles ont été infectées par le VIH à travers le monde en recevant des produits sanguins provenant d'individus infectés. Ce mode de transmission contribue à un tiers des nouvelles infections en Europe de l'Est et en Asie de l'Est (congrès AIDS 2018, Amsterdam). Les démarches préventives visant à réduire les risques de transmission du VIH par voie sanguine comprennent l'utilisation de matériel d'injection stérile, le traitement de la dépendance et en particulier le traitement de substitution des opioïdes, la PrEP et le TPE.

Populations clés dans la lutte contre la pandémie du SIDA

La connaissance de ces trois modes de transmission du VIH a permis de définir des **populations cibles que certaines pratiques** exposent davantage au risque d'infection par le VIH. Ces populations constituent la cible prioritaire des programmes de prévention. Dans certaines régions du monde cependant, les pratiques de ces populations sont stigmatisées voire criminalisées, ce qui les dissuade d'accéder aux structures de soin et de prendre connaissance de leur statut sérologique. La lutte contre la stigmatisation et contre les lois coercitives qui condamnent certaines pratiques de ces populations est donc au cœur du programme 90-90-90 initié par l'ONUSIDA. Les principales populations à risque sont les Hommes ayant des relations Sexuelles avec des Hommes, les Travailleurs(euses) du Sexe, les migrants, les Usagers de Drogue, les détenus, les individus transgenres et les individus transexuels.

2. Origine et diversité génétique du VIH

a. Taxonomie du VIH

Les virus sont composés de deux éléments constants : **un génome** composé d'ADN ou d'ARN et une structure protéique qui protège le génome, appelée **capside**. Certains virus, qualifiés d'enveloppés, possèdent une troisième structure : une **enveloppe** qui entoure la capsid. Du fait de leur structure relativement simple, les virus sont des parasites intracellulaires obligatoires qui nécessitent la machinerie cellulaire et moléculaire de leurs cellules hôtes pour se répliquer. Le système de classification des virus est polythétique et basé sur : (i) la nature de l'acide nucléique qui compose le génome viral et l'organisation génomique du virus, (ii) la symétrie de la capsid, (iii) la présence ou non d'une enveloppe, et (iv) la nature de l'hôte (ICTV ; *International Committee Taxonomy on Viruses*). **Le VIH-1 est un virus enveloppé qui possède une symétrie de capsid complexe et deux copies d'ARN simple brin de polarité positive.** A l'heure actuelle, le VIH-1 appartient :

- **A l'ordre des Orterviraes.** Cet ordre regroupe 5 familles de virus à ARN qui possèdent une **transcriptase inverse** (TI) et utilisent un ARN de transfert (ARNt) comme matrice pour l'étape de transcription inverse. Le génome des virus appartenant à cet ordre est composé de deux copies d'ARN simple brin et présente 4 gènes principaux dans l'ordre suivant : 5'-*gag-pro-pol-env*-3' (Figure 2).

- **A la famille des Rétroviridae.** Les rétrovirus possèdent une structure protéique localisée à l'intérieur de la capsid qui protège le génome viral, qualifiée de nucléocapside (Figure 2). Certains rétrovirus possèdent des gènes codant pour des protéines non-structurales qualifiées de **régulatrices ou d'auxiliaires**. Ces protéines exercent un rôle dans la régulation de l'expression des gènes viraux et de la réplication virale. La présence ou non de telles protéines dans le génome des rétrovirus distingue les **rétrovirus simples** (comme le MLV) des **rétrovirus complexes** (comme HTLV-1 et les VIH-1 et 2).
- **A la Sous-famille des Orthoretrovirinae :** Contrairement à l'autre sous-famille de rétrovirus, les spumarétrovirus, l'étape de transcription inverse a lieu lorsque l'ARN viral est inséré dans la cellule hôte.
- **Au genre des Lentivirus :** Le genre des Lentivirus comprend le Virus de l'Immunodéficience Féline (FIV), le Virus de l'Immunodéficience Simienne (VIS) et les deux espèces de VIH : le VIH-1 et le VIH-2 (Figure 2). Les lentivirus sont des rétrovirus complexes qui se distinguent des autres rétrovirus par la morphologie conique de leur capsid. Ils peuvent être divisés en 5 groupes en fonction de l'hôte qu'ils infectent : primates, moutons et/ou chèvres, chevaux, félins et bovidés. **Les lentivirus de primates (VIH et VIS) se distinguent des autres lentivirus par l'utilisation de la protéine CD4 et d'un récepteur de chémokine (CCR5 ou CXCR4) comme co-récepteurs d'entrée dans la cellule hôte.**

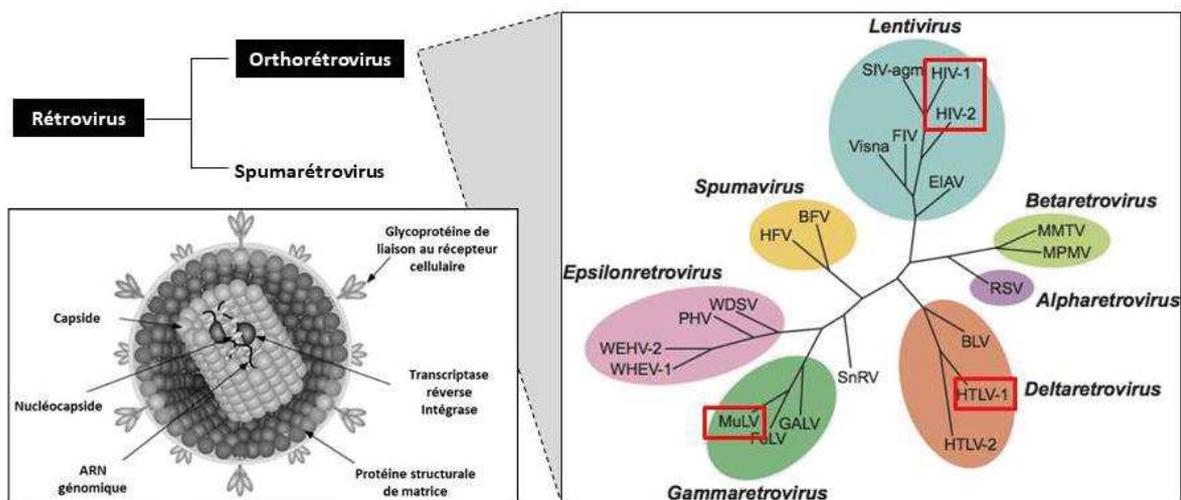


Figure 2 : Phylogénie et structure générale des Rétrovirus. Les rétrovirus complexes HIV-1, HIV-2 et HTLV-1 ainsi que le rétrovirus simple MuLV sont encadrés en rouge sur l'arbre phylogénétique. Source : ictvonline.org.

b. Origine simienne des VIH-1 et -2

L'émergence du VIH est le fruit d'au moins 13 franchissements de barrière inter-espèce du VIS de PNH (Primates non Humains) à l'Homme (VIH-1 et VIH-2). Les deux espèces de VIH partagent le même hôte naturel, infectent les mêmes cellules cibles et induisent une immunodéficience chez leur hôte. Les VIH-1 et -2 sont issus de plusieurs événements indépendants de transmission inter-espèce du VIS des PNH à l'Homme. L'une des hypothèses qui a été avancée pour expliquer ces événements de transmission est l'exposition sanguine de l'Homme aux PNH d'Afrique, notamment lors de pratiques de chasse et de consommation de viande de brousse (Etienne et Peeters 2010). Du fait de (i) la grande variété des VIS circulant chez les PNH en Afrique (Santiago et al. 2002; Villabona-Arenas et al. 2018) et (ii) de l'exposition croissante des Hommes aux PNH en Afrique sub-Saharienne (Expansion des industries forestières, augmentation de la consommation de viande de brousse), il n'est pas impossible que de nouveaux événements de transmissions inter-espèces adviennent dans le futur.

- **Origines du VIH-2** : Après sa découverte en 1986 (Clavel et al. 1986), des études ont confirmé l'homologie entre le VIH-2 et le VIS du mangabey enfumé (VIS sm) (Hirsch et al. 1989). Le VIS sm et le VIH-2 possèdent le gène *vpx* qui est absent du génome du VIH-1 (Figure 3B). De plus, la répartition géographique du VIH-2 coïncide avec celle des mangabeys enfumés en Afrique de l'Ouest.
- **Origines du VIH-1** : Le VIH-1 a été introduit au moins 4 fois dans la population humaine. Le VIH-1 comprend 4 groupes phylogénétiques qui reflètent ces 4 événements de transmission inter-espèce des PNH à l'Homme (Figure 3A): **les groupes M (Majeur), O (Outlier), N (Non-M et non-O) et P** (Hahn et al. 2000; Keele et al. 2006; Plantier et al. 2009; Etienne et Peeters 2010; Delaunay et al. 2011). Le VIS du chimpanzé (VIS cpz) est le précurseur des groupes M et N du VIH-1 (Huet et al. 1990; Keele et al. 2006), et le VIS du Gorille (VIS gor), qui a pour précurseur le VIS cpz, est le précurseur des groupes O et P du VIH-1 (Van Heuverswyn et al. 2006; Takehisa et al. 2009; D'arc et al. 2015) (Figure 3A).

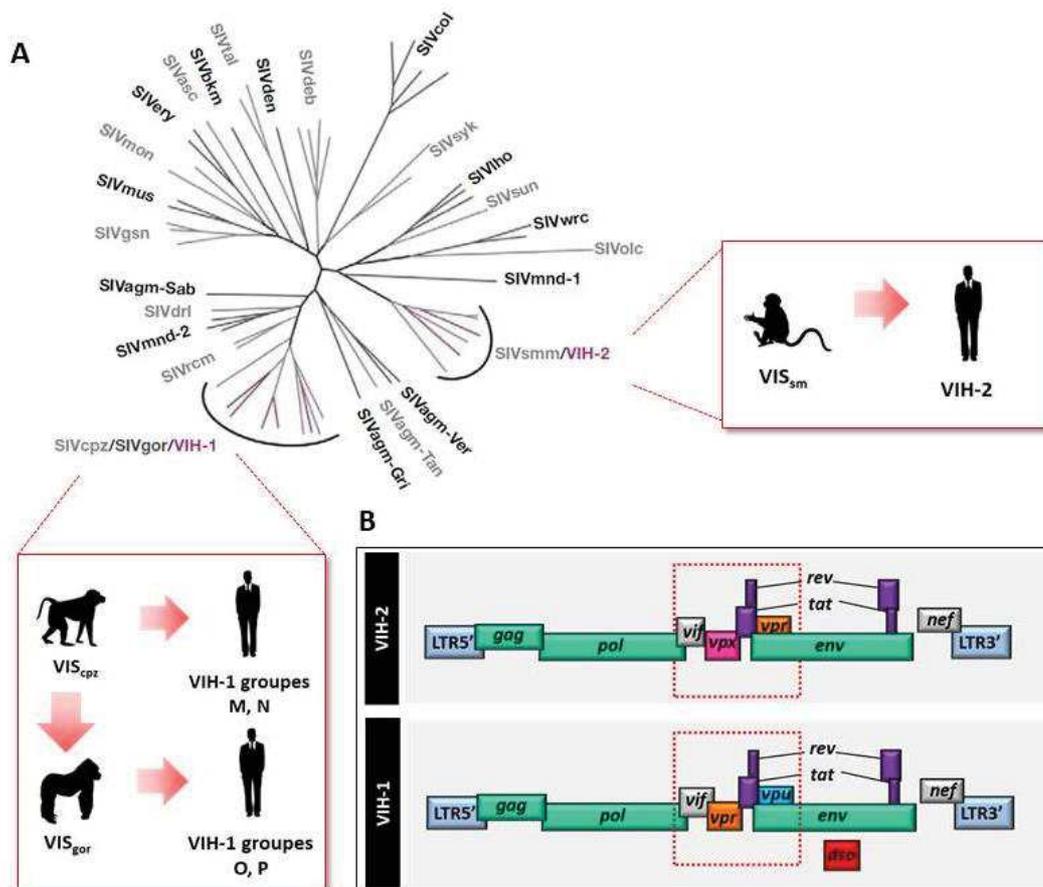


Figure 3 : Diversité génétique des différentes lignées de VIS et de VIH. **A.** Arbre phylogénétique (Etienne et Peeters 2010) des lignées de VIS et de VIH. **B.** Organisation génomique comparée des VIH-1 et -2. La zone encadrée en rouge souligne les différences génomiques entre les VIH-1 et -2.

Les VIH-1 et -2 partagent une **organisation génomique globalement similaire**. Les principales différences génomiques entre les VIH-1 et -2 concernent les gènes codant pour les protéines auxiliaires (Figure 3B). La localisation génomique de *vpr* et l'extrémité 3' de *vif* diffèrent entre les VIH-1 et -2. Ces différences proviendraient de la perte du gène *vpx* lors de la création du VIS cpz (Etienne et al. 2013b). La perte de *vpx* et de l'extrémité 3' du gène *vif* ont été transmis du VIS cpz au VIH-1, tandis que le VIH-2 a conservé les gènes auxiliaires de son précurseur, le VIS sm (Figure 3A et B). Par ailleurs, le gène *vpu* est uniquement retrouvé dans le génome de quelques lentivirus : dans le génome du VIH-1 et de ses précurseurs VIS cpz et VIS gor, dans le génome du VIS gsn, l'un des précurseurs du VIS cpz, et dans le génome des VIS mus, VIS den et VIS mon (Barlow et al. 2003; Courgnaud et al. 2003; Dazza et al. 2005; Van Heuverswyn et al. 2006; Takehisa et al. 2009). Le VIH-1 se distingue également du VIH-2 par la présence sur le brin antisens de son génome proviral du gène *asp* (Miller 1988; Cassan

et al. 2016). **Je reviendrai sur la conservation du gène *asp* dans la partie III2a de l'introduction.**

Outre l'organisation de leur génome, les VIH-1 et -2 se distinguent par leur prévalence dans la population mondiale et par l'évolution de la pathologie qu'ils génèrent chez leur hôte naturel. En effet, les individus infectés par le VIH-2 progressent plus lentement vers la phase SIDA (van der Loeff et al. 2010). De plus, le VIH-2 se transmet moins efficacement que le VIH-1 par voie sexuelle (Gottlieb et al. 2006), et très rarement de la mère à l'enfant (Hawes et al. 2008). En outre, le VIH-2 est capable d'infecter les cellules dendritiques (DC) de manière productive, ce qui favorise sa reconnaissance par le système immunitaire de l'hôte (Lahaye et al. 2013). A l'inverse, les DC sont rarement infectées de manière productive par le VIH-1, ce qui contribue à son échappement au système immunitaire (Moris et al. 2004; Hrecka et al. 2011; Laguette et al. 2011; Puigdomènech et al. 2013).

c. Phylogénie du VIH-1

Les quatre événements indépendants de franchissement de barrière inter-espèce du VIS à l'origine des quatre groupes phylogénétiques M, N, O et P du VIH-1 (Figure 3) ont eu des issues très différentes, comme en témoignent la grande disparité de leur prévalence dans le monde (Etienne et Peeters 2010):

- **Le groupe M** a connu une expansion rapide et mondiale. Il est à l'origine de la pandémie actuelle du SIDA, et est à lui seul responsable depuis le début de l'épidémie de l'infection de plus de 70 millions de personnes à travers le monde. Le groupe M est composé de différents sous-types et de formes recombinantes dont la prévalence varie également à travers le monde (Hemelaar et al. 2019).
- **Le groupe O (Outlier)** a connu une croissance endémique limitée à l'Afrique de l'Ouest, et plus spécifiquement au Cameroun. Des cas sporadiques d'infection par le groupe O du VIH-1 ont également été reportés aux Etats-unis et en Europe (Mourez et al. 2013). En France, l'étude RES-O a identifié 143 personnes infectées par le groupe O depuis 1992 (Depatureaux et al. 2010), ce qui constitue le plus large réseau d'infections du groupe O hors du Cameroun. Malgré des cas d'infections reportés sur trois continents différents, le groupe O n'a pas connu d'expansion pandémique, contrairement au groupe M.

- **Les groupes N (Non-M et non-O) et P** sont rares et ne se sont transmis qu'à une fraction d'individus Camerounais. Le VIH-1 du groupe N a été retrouvé chez 15 individus (Delaugerre et al. 2011) depuis sa découverte en 1998 chez une patiente Camerounaise. Le groupe P a été isolé en 2009 d'une Camerounaise asymptomatique qui vivait en France depuis 2004 (Plantier et al. 2009). Un deuxième individu infecté par le groupe P a été décrit au Cameroun.

L'approche de bio-informatique développée par l'équipe du Pr Eric Delaporte a permis de dater le **MRC**A (*More Recent Common Ancestor*) du groupe M à 1931 (Salemi et al. 2001), date qui a par la suite été avancée à 1908 (\pm 1884-1924) grâce à l'analyse d'une biopsie de ganglions lymphatiques prélevée d'une femme infectée vivant en République Démocratique du Congo (RDC) (Worobey et al. 2008). Les MRCA des groupes O, N et P ont quant à eux été respectivement estimés à 1920 (\pm 1890, 1940), 1963 (\pm 1948-1977) et aux années 1980 (Wertheim et Worobey 2009). Récemment, une étude a confirmé **l'introduction du VIH-1 du groupe M dans la population au début du XXe siècle, et a démontré que la capitale de la RDC était l'épicentre de la pandémie actuelle** (Faria et al. 2014).

d. Diversité génétique du groupe M

Mécanismes à l'origine de la diversité génétique du groupe M

Le groupe M est à lui seul responsable de la pandémie du SIDA. Au cours de sa propagation dans la population mondiale au siècle dernier, la diversité génétique du groupe M du VIH-1 a atteint un niveau considérable. Cette incroyable diversité génétique a conduit à une nouvelle classification à l'intérieur du groupe M. Ce groupe est ainsi composé de 10 sous-types (A, B, C, D, F, G, H, I, J et K) ainsi que de nombreuses formes recombinantes qui résultent de la recombinaison d'au moins deux sous-types du groupe M. Ces formes recombinantes sont qualifiées de :

- **CRF (*Circulating Recombinant Forms*)** si elles sont entièrement séquencées et retrouvées chez au moins trois individus différents (Figure 4B).
- **URF (*Unique Recombinant Forms*)** dans le cas contraire.

La diversité génétique intra-sous-type continue à augmenter avec le temps à l'échelle intra-individuelle et à l'échelle des populations. Cette **diversité génétique est multifactorielle**, et

découle globalement de deux mécanismes génétiques : (i) l'incorporation de mutations dans le génome viral, et (ii) la recombinaison entre génomes viraux intra- ou inter-sous-types.

1. **Incorporation de mutations dans le génome viral**. Le taux de mutation du VIH-1 est supérieur au taux de mutation moyen des rétrovirus (Lemey et al. 2006), ce qui lui confère une vitesse d'évolution importante et lui permet de s'adapter aux contraintes imposées par l'hôte. Deux mécanismes sont majoritairement à l'origine de ce fort taux de mutations :

- **L'infidélité de la transcriptase inverse**. L'étape de transcription inverse (Figure 4A) fait intervenir une enzyme, la transcriptase inverse (TI). Cette enzyme est une ADN polymérase ARN dépendante qui permet de rétro-transcrire l'ARN viral simple brin en ADN double brin. La TI du VIH-1 est peu "fidèle" : elle incorpore environ 1 mutation (substitution ou délétion) par génome et par cycle viral (Huang et Wooley 2005), et ne possède pas d'activité de correction de ces mutations. Une multitude de variants viraux sont donc produits à partir d'une même cellule infectée. Ces nouvelles espèces virales entraînent une grande diversité génétique au cours du temps à l'échelle intra-individuelle.
- **Les mutations induites par APOBEC3** : Les protéines appartenant à la famille de cytidines déaminases APOBEC3 induisent des mutations de type C→U lors de la synthèse du brin « *minus strong stop* » de l'ADN viral, ce qui se traduit par des mutations de type G→A dans l'ADN proviral. Les protéines APOBEC3 sont contrées par la protéine virale Vif (Sheehy et al. 2002). Cependant, plusieurs études ont démontré que certaines protéines APOBEC3 cellulaires échappaient à l'antagonisme de Vif, et que les mutations de l'ADN proviral qui en résultaient contribuaient à la diversité des espèces virales à l'échelle intra-individuelle (Bourara et al. 2007; Kim et al. 2015). Une étude réalisée sur les cellules de patients non traités a rapporté que le taux de mutation de l'ADN viral intracellulaire excédait de deux logs celui de l'ARN viral plasmatique, et que les hypermutations conférées par les protéines cellulaires APOBEC3D, F, G et H étaient à l'origine de 98 % des mutations retrouvées dans l'ADN viral intracellulaire (Cuevas et al. 2015). Une grande partie des hypermutations induites par les protéines APOBEC3 sont donc « léthales » pour le virus, ce qui explique les différences dans les taux de mutations de l'ADN viral intracellulaire et de l'ARN viral plasmatique.

2. **Recombinaison de deux ou plusieurs virus**. En plus des nouvelles espèces virales qui apparaissent à l'échelle intra-individuelle, des mécanismes de recombinaisons intra-sous-

types (entre variants viraux) ou inter-sous-types peuvent avoir lieu. Ces recombinaisons ont lieu entre les deux copies d'ARN génomique du virus. Lorsqu'une cellule est infectée par deux virus différents, les ARN génomiques des deux virus produits *de novo* dans la cellule peuvent être assemblés au sein de la même particule virale. Lorsque le virus possédant ces deux copies d'ARN viral infecte une nouvelle cellule, des événements de recombinaison peuvent alors avoir lieu entre ces deux molécules d'ARN pendant l'étape de transcription inverse, ce qui crée un **virus recombinant** (Figure 4B). L'infection d'une cellule déjà infectée par un autre variant viral est qualifiée de **co-infection**. Ce phénomène est à l'origine de la création de nouvelles formes recombinantes au sein du groupe M du VIH-1. L'existence de formes recombinantes n'est cependant pas restreinte au groupe M. En effet, trois formes recombinantes intergroupes M/O ont été rapportées entre 1999 et 2004 chez des patients Camerounais (Peeters et al. 1999; Takehisa et al. 1999; Yamaguchi et al. 2004), et une étude récente a suggéré la transmission horizontale de ce virus recombinant intergroupe (Ngoupo et al. 2016). Par ailleurs, un virus recombinant intra-groupe O a également été décrit (Roques et al. 2002).

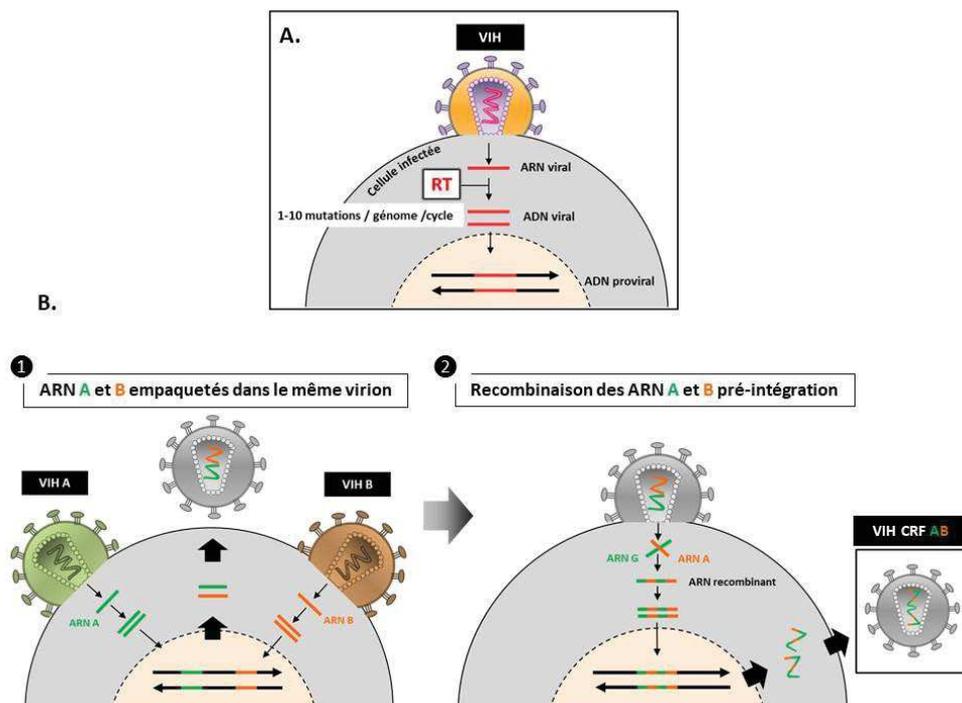


Figure 4 : Mécanismes à l'origine de la diversité génétique du groupe M. A. Représentation schématique de la transcription inverse du VIH. B. Mécanismes moléculaires à l'origine de la recombinaison virale. ① Une cellule cible est co-infectée par deux virus de sous-types différents. Suite à l'intégration de l'ADN double brin des deux virus dans le génome de la cellule, une copie d'ARN génomique provenant de chaque virus peut être encapsidée au sein de la même particule virale. ② Lorsque ce virus infecte une nouvelle cellule, des événements de recombinaison entre les deux copies d'ARN viral peuvent mener à la formation d'un nouveau virus recombinant avec un génome hybride.

Prévalence des sous-types du groupe M

Les différents sous-types et CRF du groupe M ont une distribution géographique très disparate (Figure 5). Le **sous-type C** est le plus prévalent dans l'ensemble de la population mondiale infectée. Entre 2010 et 2015, il a été estimé que le sous-type C était responsable de 46.6% de l'ensemble des infections du VIH-1 dans le monde (Hemelaar et al. 2019). Par ordre de prévalence mondiale viennent ensuite le sous-type B (12.1 % des infections mondiales entre 2010-15), le sous-type A (10.3%), le CRF02_AG (7.7%), le CRF01AE (5.3%), le sous-type G (4.6%) et le sous-type D (2.7%) (Figure 5) (Hemelaar et al. 2019). Le sous-type C est surtout prédominant en Afrique du Sud, en Afrique de l'Est et en Inde. Le **sous-type B** est le principal contributeur de la pandémie en Europe de l'Ouest et Centrale, en Amérique du Nord, aux Caraïbes, en Amérique latine et en Océanie. En Europe de l'Est et en Asie Centrale, le sous-type A est majoritaire, mais le sous-type B ainsi que d'autres CRF contribuent également de manière non négligeable aux infections dans ces régions du monde. Au Moyen orient et en Afrique du Nord, les infections sont majoritairement causées par des CRF du VIH-1. En Asie de l'Est et du Sud-Est, le CRF01_AE prédomine dans la population infectée. L'Afrique Centrale est la région du monde qui possède la plus forte proportion d'URF (Figure 5 ; 21.3% des infections en Afrique Centrale entre 2010 et 2015).

Les différentes prévalences des sous-types et CRF du groupe M dans les différentes régions du monde résultent probablement d'une combinaison de facteurs propres aux populations dans lesquelles ils se sont répandus (facteurs socio-démographiques et comportementaux, fonds ethniques...) et de facteurs génétiques propres à chaque sous-type/CRF. En effet, les différents sous-types du VIH-1 ont émergé et se sont propagés dans des populations distinctes : leur évolution a donc été façonnée par le fond ethnique de ces populations. Certaines études ont comparé la capacité répliquative (Ariën et al. 2005, 2006) et l'efficacité de transmission (Renjifo et al. 2001; Yang et al. 2003) du VIH-1 de différents sous-types. Ces études qui ont été réalisées dans des modèles cellulaires *in vitro* ou dans des populations ethniquement distinctes *in vivo* sont extrêmement intéressantes, mais ne permettent pas d'expliquer complètement la différence de distribution des sous-types du VIH-1 à l'échelle planétaire.

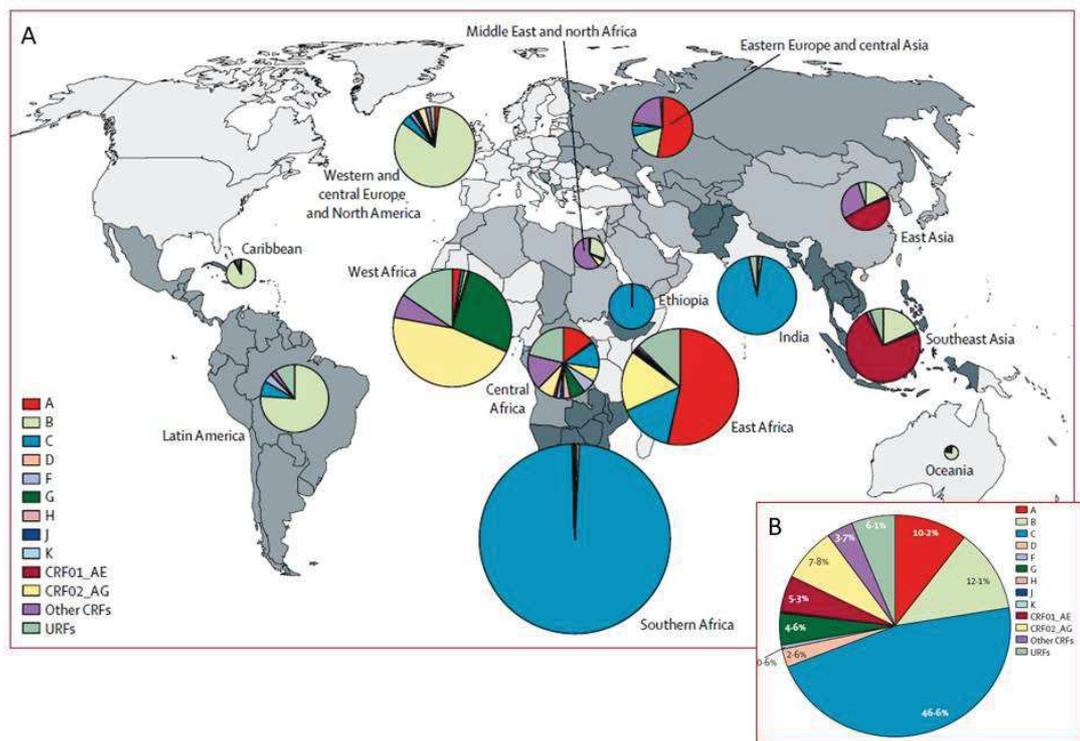


Figure 5 : Répartition mondiale des principaux sous-types et CRF du groupe M du VIH-1 entre 2010 et 2015 (Hemelaar et al. 2019). A. Planisphère montrant la répartition des principaux sous-types et CRF du VIH-1. B. Proportion des principaux sous-types et CRF du groupe M du VIH-1 dans la population mondiale entre 2010 et 2015.

3. Mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans l'infection par le VIH-1

a. Structure et organisation génomique du VIH-1

Le VIH-1 est un virus enveloppé qui possède une capsid conique et une nucléocapside protégeant deux copies d'ARN simple brin de polarité positive (Figure 6). Le génome proviral du VIH-1 est encadré à ses extrémités 5' et 3' par deux régions nommées LTR (*Long Terminal Repeat*). Les LTR 5' et 3' sont identiques et composés de 3 régions (Figure 6B):

- **La région U3**, qui agit comme **promoteur de la transcription virale**. La région U3 est composée d'une **région modulatrice** et d'une **région enhancer**. La région modulatrice contient des sites de liaison à plusieurs facteurs cellulaires tels que NFAT et AP-1, dont la liaison résulte en une activation ou une répression de la transcription virale (Gaynor 1992; Naghavi et al. 2001). La région *enhancer* contient deux sites de liaison au facteur de transcription NF-kB, 3 sites de liaison au facteur de transcription SP1 et une TATA box. Un

4^e site de liaison au facteur de transcription SP1 est localisé en 5' de la région U3 (Peeters et al. 1996). NF-kB active la transcription virale en réponse à un large nombre de stimuli extracellulaires, incluant les esters de phorbols et de nombreuses cytokines (Gaynor 1992). Les différences dans le nombre de sites de liaison aux facteurs NF-kB et AP-1 observées dans le LTR de certains sous-types du VIH-1 (C et CRF01_AE) ont été proposées pour expliquer en partie les différences de prévalences mondiales de ces sous-types (Montano et al. 1997; van Opijnen et al. 2004).

- **La région R**, qui contient le site d'initiation de la transcription virale sens, le signal de polyadénylation des différents transcrits sens et l'élément de réponse à la protéine Tat (TAR). Le TAR est une région qui forme une structure tige-boucle sur les transcrits sens du VIH-1, et sur laquelle se fixe la protéine Tat (Sodroski et al. 1985).
- **La région U5** contient 3 sites de liaison aux facteurs de transcription AP-1.

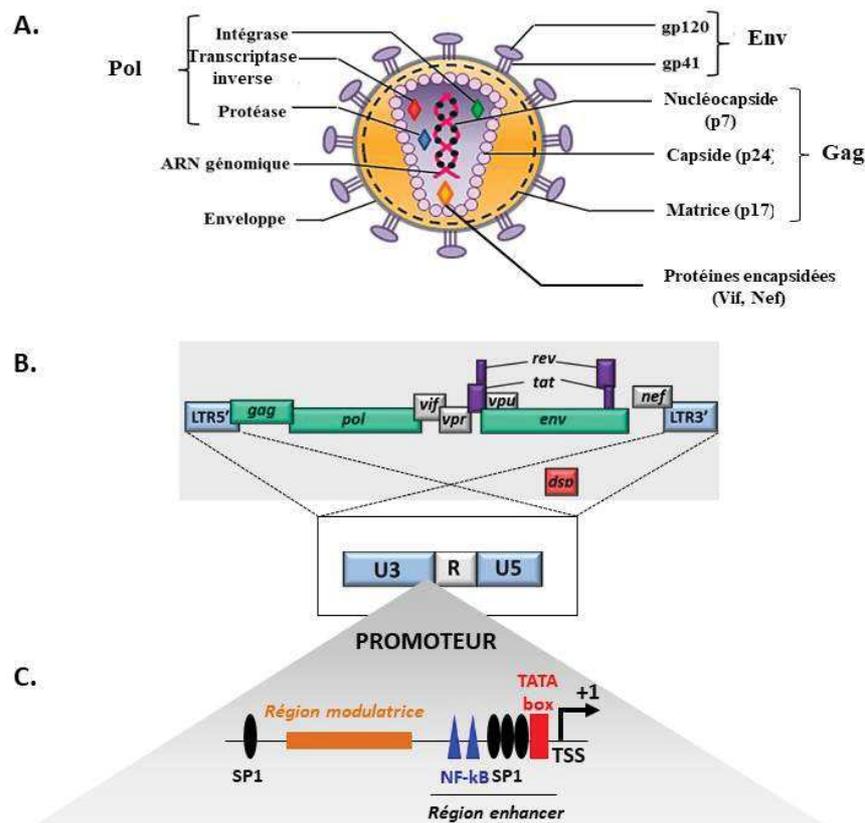


Figure 6 : Structure de la particule virale et organisation génomique du VIH-1. **A.** Structure de la particule virale mature du VIH-1. **B.** Organisation génomique du VIH-1. Les gènes verts sont communs à tous les rétrovirus. Les gènes violets codent pour des protéines régulatrices, les gènes gris pour des protéines auxiliaires et le gène rouge pour une protéine codée par le brin antisens du génome proviral. Le gène *asp* n'est présent que dans le groupe M du VIH-1. **C.** Structure de la région promotrice U3 des LTR 5' et 3' du VIH-1. TSS : site d'initiation de la transcription.

Le LTR 5' a longtemps été considéré comme l'unique promoteur du VIH-1. Or, notre équipe a démontré au cours des deux dernières décennies que le LTR 3' du VIH-1 fonctionnait également comme un promoteur capable d'initier, à l'extrémité 3' du génome proviral, la transcription du brin antisens du VIH-1 (Landry et al. 2007; Laverdure et al. 2012; Arpin-André et al. 2014). **La transcription antisens sera détaillée dans la partie III de l'introduction.**

Le VIH-1 possède dans son génome les gènes *gag*, *pol* et *env* codant respectivement pour des protéines structurales, pour des enzymes virales et pour des glycoprotéines d'enveloppe (Figure 6B). Il code également pour les protéines régulatrices Tat et Rev, et pour les protéines auxiliaires Nef, Vif, Vpu et Vpr. Enfin, les virus du groupe M du VIH-1 possèdent également un gène situé sur le brin antisens du génome proviral qui code pour une protéine nommée **ASP pour *AntiSense Protein***. **Ce gène ainsi que ses produits d'expression seront détaillés dans la partie III de l'introduction.**

b. Les protéines Gag, Pol et Env du VIH-1

Le VIH-1 compacte son information génétique en employant différentes stratégies telles que la création de gènes chevauchants (**voir partie IIIa de l'introduction**) et des mécanismes traductionnels tels que le changement de cadre de lecture du ribosome (*ribosomal frameshifting*) qui permet, à partir d'un seul ARN polycistronique, la synthèse de plusieurs protéines virales. De plus, afin de limiter la taille de son protéome, le VIH-1 code pour des protéines multifonctionnelles dont la plupart sont composées de plusieurs sous-unités douées d'une fonction différente.

Chez tous les rétrovirus, les protéines structurales codées par le gène *gag* (*group of antigens*) et les protéines enzymatiques codées par le gène *pol* (pour polymérase) sont synthétisées en tant que polyprotéines à partir d'un unique ARN messager. Deux polyprotéines sont produites à partir du même ARN : la polyprotéine Gag (Pr55Gag) et la polyprotéine Gag-Pol (Pr160GagPol) (Figure 7). Pr160GagPol résulte d'un changement de cadre de lecture du ribosome effectué à la fin de la séquence codant pour Pr55Gag dans environ 5% des cas. Pr55Gag et Pr160GagPol sont clivées par la protéase virale en plusieurs protéines lors de la maturation de la particule virale. La glycoprotéine gp160 codée par le gène *env* (enveloppe) est clivée en deux glycoprotéines distinctes, gp120 et gp41, par des protéases cellulaires lors de son passage dans l'appareil de Golgi (Figure 7).

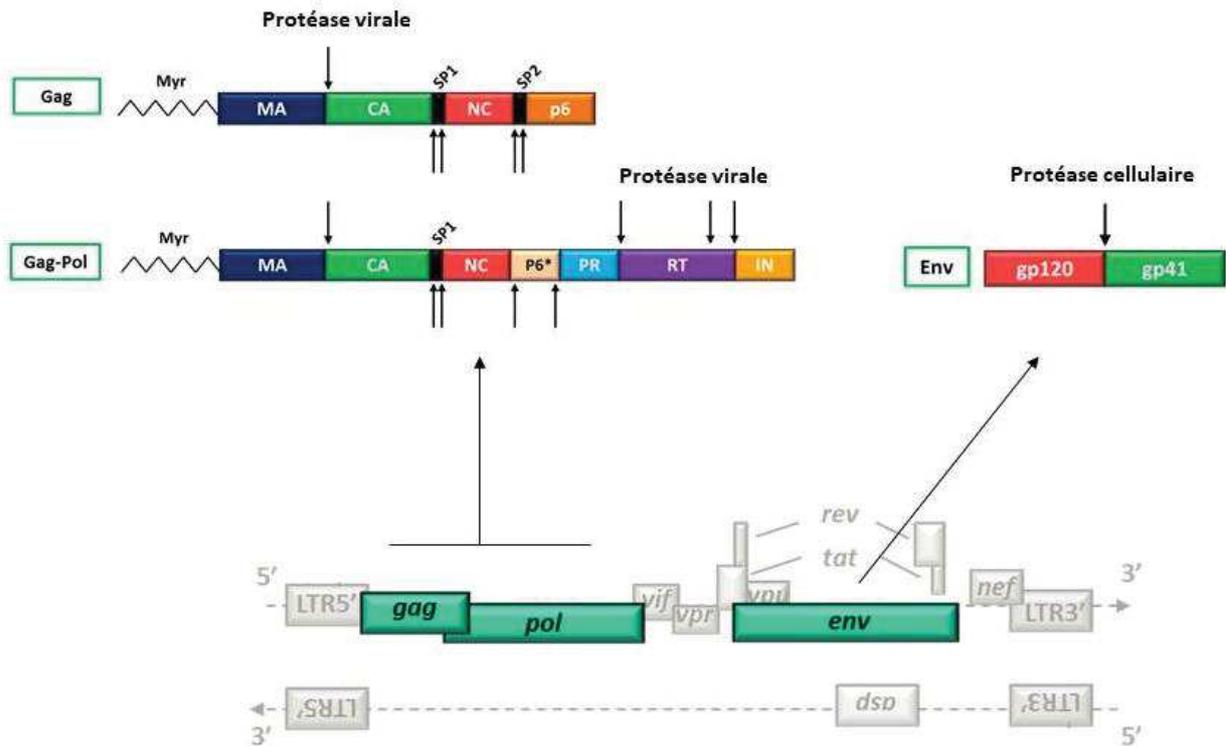


Figure 7 : Principaux domaines des polyprotéines Pr55 Gag, Pr160 Gag-Pol et Env. Les sites de clivage par la protéase virale ou par les protéases cellulaires sont indiqués par des flèches.

Pr55Gag est une polyprotéine de 55 KDa clivée lors de la maturation de la particule virale en 4 protéines principales et deux peptides d'espaceur nommés SP1 (Spacer Peptide 1) et SP2 (Spacer Peptide 2) (Figure 7). Ces protéines ont essentiellement un rôle structural et sont nommées :

- **Protéine de matrice (MAP17).** MA est principalement impliquée dans le ciblage et l'oligomérisation de Pr55Gag à la membrane plasmique (Burniston et al. 1999) et dans l'incorporation des glycoprotéines d'enveloppe à la membrane plasmique lors de la formation de la particule virale immature. Ces fonctions sont assurées grâce la myristoylation de MA qui permet l'ancrage de Pr55Gag à la membrane plasmique (Göttlinger et al. 1989).
- **La protéine de capsid (CAp24),** qui est principalement impliquée dans la formation de la capsid virale et dans la régulation de l'import nucléaire du génome viral. La protéine CAp24 s'assemble en trimères qui s'assembleront entre eux pour former des hexamères de trimères.

- **La protéine de nucléocapside (NCp7)**, également impliquée dans l'oligomérisation de Pr55Gag à la membrane plasmique (Burniston et al. 1999). NCp7 est également impliquée dans l'encapsulation de l'ARN génomique, et joue le rôle de chaperonne pour l'ARN génomique.
- **La protéine p6**, qui est entre autres impliquée dans l'incorporation de la protéine Vpr du VIH-1 et de la protéine Vpx du VIH-2 dans la particule virale néoformée (Yu et al. 1988; Paxton et al. 1993; Accola et al. 1999).

Dans la polyprotéine précurseur Pr160GagPol, qui est produite suivant un mécanisme de changement de cadre du ribosome en 3' de la séquence codante de Gag, le peptide SP2 et la protéine p6 sont remplacés par une région « trans-cadre » (*transframe*) nommée p6* ou p6pol (Figure 7) (Freed 2015). **Pr160GagPol** est clivée lors de la maturation de la particule virale en trois enzymes (Figure 7) :

- **La protéase (PR)**, une enzyme impliquée dans le clivage des polyprotéines Pr55Gag et Pr160GagPol dans la particule virale mature.
- **L'intégrase (IN)**. Cette enzyme est impliquée dans l'intégration de l'ADN viral double brin dans le génome de la cellule hôte.
- **La transcriptase inverse (TI)**. La forme active de la TI est un hétéro-dimère composé de la sous-unité catalytique p66 et de la sous-unité p51. **La sous-unité p66** est composée d'un domaine polymérase et d'un domaine RH. Le domaine polymérase présente une activité ADN polymérase dépendante de l'ARN et une activité ADN polymérase dépendante de l'ADN. Le domaine RH possède une activité RNase H qui permet la dégradation du brin d'ARN lors de la formation transitoire du complexe hybride ARN/ADN. La sous-unité p51 est une polymérase non fonctionnelle, dépourvue d'activité enzymatique.

Gp160 est la glycoprotéine d'enveloppe précurseur codée par le gène *env*. Gp160 est fortement glycosylée lors de son passage dans le réticulum endoplasmique et subit un clivage par des protéases cellulaires de type furine lors de son passage dans l'appareil de Golgi. Il en résulte deux glycoprotéines d'enveloppe : la glycoprotéine 41 (gp41) transmembranaire et la glycoprotéine 120 (gp120) extracellulaire (Figure 7). Les hétérodimères gp41/gp120 s'assemblent en trimères pour former **le ligand du récepteur CD4**.

- **Gp 41** possède un domaine transmembranaire et un domaine de fusion. Suite à la liaison de gp120 avec CD4 et CXCR4 ou CCR5, le peptide de fusion de gp41 s'insère dans la membrane plasmique de la cellule hôte. La gp41 est la première cible de la réponse humorale de l'hôte (Makvandi-Nejad et Rowland-Jones 2015). Les anticorps dirigés contre la gp41 reconnaissent préférentiellement la région extracellulaire située à proximité de la membrane (*Membrane Proximal External Region* ; MPER).
- **Gp120** est responsable de la liaison aux récepteurs CD4 et CCR5/CXCR4. Elle est composée de 5 régions constantes bien conservées (C1-C5) et de 5 régions hypervariables (V1-V5). Ces régions variables jouent un rôle critique dans l'échappement du virus au système immunitaire de l'hôte.

c. Les protéines régulatrices du VIH-1

Le VIH-1 possède, comme HTLV-I, deux gènes codant pour des protéines régulatrices qui interviennent principalement dans l'élongation de la transcription virale (Tat) et dans l'export des ARN messagers viraux non épissés ou mono-épissés (Rev) (Figure 8). Ces deux protéines sont indispensables à la réplication virale.

Tat (*Transactivator of transcription*) est une protéine basique multifonctionnelle de 101 acides aminés, codée par deux exons séparés. La gamme des fonctions exercées par Tat peut être divisée en deux branches :

1. **Sa capacité à induire l'élongation de la transcription du génome viral.** Chez le VIH-1, le LTR 5' agit comme promoteur des gènes situés sur le brin sens du génome proviral. Si l'initiation de la transcription repose majoritairement sur la liaison des facteurs de transcription SP1 et NF-κB au LTR 5', **l'élongation** de la transcription virale repose quant à elle sur :

- L'interaction de Tat avec le complexe pTEFb composé des protéines CDK9 et Cycline T1 (Figure 8).
- La fixation du complexe Tat-pTEFb sur son élément de réponse, le TAR (Sodroski et al. 1985; Kao et al. 1987). Au niveau du TAR, la polymérase cellulaire effectue une pause. Lorsque le complexe Tat/pTEFb se fixe sur le TAR, la protéine CDK9 phosphoryle le domaine C-terminal de la polymérase cellulaire, ce qui augmente sa processivité, et donc l'élongation de la transcription (Karn et Stoltzfus 2012).

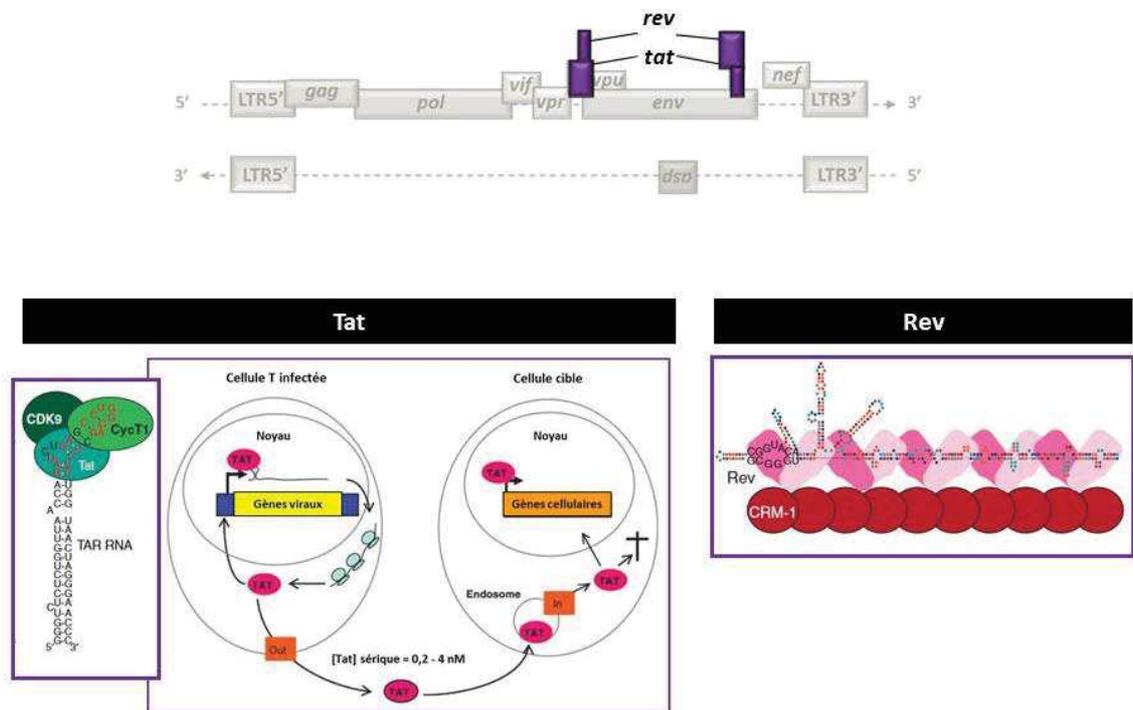


Figure 8 : Fonctions associées aux protéines régulatrices du VIH-1. Les gènes codant pour Tat et Rev sont représentés en violet. Les principales fonctions de Tat, le complexe Tat/pTEFb sur l'élément de réponse TAR et le complexe Rev/CRM-1 sur l'élément de réponse REV sont représentés (Debaisieux et al. 2012; Karn et Stoltzfus 2012).

2. Sa fonction de toxine virale. Environ les deux tiers de la quantité de Tat produite sont sécrétés au cours de la vie d'un T CD4⁺ infecté. Tat est sécrétée de manière non conventionnelle, via son interaction avec le phosphatidylinositol (4,5) bisphosphate (PIP2) présent dans la couche lipidique interne de la membrane plasmique (Figure 8). Tat est ainsi retrouvée à une concentration de l'ordre du nanomolaire dans le sérum des individus infectés (Schatz et al. 2018). La protéine Tat sécrétée peut être internalisée par endocytose dans les cellules non infectées, où elle exerce une fonction de toxine en interagissant avec des partenaires cytoplasmiques ou en intégrant le noyau où elle module la transcription de gènes cibles (Debaisieux et al. 2012). Tat internalisée a été associée à l'inhibition de la capacité sécrétoire des cellules neuro-endocrines (Tryoen-Tóth et al. 2013), et à l'inhibition de la phagocytose médiée par les récepteurs aux fragments Fc des anticorps dans les macrophages, les neutrophiles et les monocytes (Debaisieux et al. 2015). Une étude récente réalisée par notre équipe a démontré que Tat subissait une palmitoylation dans les cellules non infectées,

suggérant l'implication de cette modification post-traductionnelle dans la perturbation des capacités sécrétoires et phagocytaires décrite plus haut (Chopard et al. 2018).

La protéine Rev est responsable de l'export des transcrits non épissés et mono-épissés du VIH-1. En se fixant sur son élément de réponse RRE (*Rev Responsive Element*), **la protéine Rev** induit l'export nucléaire des transcrits non épissés et mono-épissés du VIH-1 (Hammariskjöld et al. 1989; Malim et al. 1989). Trois sortes de transcrits sont issus de la transcription du génome proviral : (i) des transcrits multi-épissés codant pour les protéines Tat, Rev et Nef, (ii) des transcrits mono-épissés codant pour les protéines Vif, Vpr, Env/Vpu, et (iii) un transcrit non épissé de l'ensemble du génome. Une fraction de ce transcrit non épissé code pour les polyprotéines Pr55Gag et Pr160Gag-Pol, et une autre fraction est incorporée dans les particules virales néoformées dans lesquelles elle constitue l'ARN génomique. L'export nucléaire des transcrits et la traduction des protéines virales se fait en deux temps :

- **Les transcrits multi-épissés** codant pour Tat, Rev et Nef sont exportés hors du cytoplasme et traduits en protéines. Les transcrits de Tat, Rev et Nef ne possèdent pas le RRE et sont exportés hors du noyau de manière indépendante de Rev, en suivant la voie empruntée par les ARN cellulaires dépendante du complexe Transcription Export Complex 1 (TREX1).
- Lorsque la concentration de la protéine Rev atteint un certain seuil, Rev se fixe au RRE sur **les transcrits non épissés et mono-épissés** qui se sont accumulés au niveau du noyau. La liaison de Rev au RRE induit son oligomérisation au niveau du RRE, et son interaction avec la protéine CRM-1 (Figure 8), ce qui résulte en l'export actif des transcrits non épissés et mono-épissés hors du noyau (Rekosh et Hammariskjöld 2018). Les protéines Pr55Gag, Pr160GagPol, Env, Vif, Vpr et Vpu sont alors traduites dans le cytoplasme.

d. Les protéines auxiliaires du VIH-1 et les facteurs de restriction cellulaires

Cellules Permissives et Facteurs de Restriction

Suite à la liaison des trimères de gp41/gp120 au récepteurs et co-récepteurs des cellules cibles, le VIH-1 introduit sa capsid renfermant le matériel génétique viral dans la cellule hôte, qui est alors **infectée**. L'injection du matériel viral est cependant détectée par la cellule. En

effet, certaines protéines cellulaires qualifiées de **facteurs de restriction** (FR), dont l'expression est en général induite par l'interféron de type I, détectent et ciblent des molécules virales à différentes étapes du cycle, bloquant ainsi l'infection de la cellule. Cependant, la plupart des actions antivirales des FR sont contrées par des protéines du VIH-1. Jusqu'à présent, plus de 9 groupes de FR capables d'inhiber l'infection par le VIH-1 et par d'autres lentivirus de primates ont été décrits (Figure 9). Parmi ces 9 groupes, 4 familles de FR ont été intensivement décrits : APOBEC3G, SAMHD1, Téthérine/BST-2 et TRIM-5 α .

- Lors de l'infection par le VIH, les protéines **APOBEC3G**, comme les autres membres de la famille APOBEC, sont internalisées dans la particule virale néoformée. Dans les cellules nouvellement infectées, APOBEC3G catalyse la réaction de déamination de la cythidine en uracile dans l'ADN viral simple brin issu de la transcription inverse de l'ARN viral, ce qui se traduit par des hypermutations de type G→A dans le génome proviral (Harris et al. 2003; Mangeat et al. 2003; Zhang et al. 2003; Moris et al. 2014). Les hypermutations induites par APOBEC3G conduisent à la production de protéines défectueuses et de particules virales non fonctionnelles ainsi qu'à la dégradation de l'ADN viral par des endonucléases, et inhibent donc fortement la réplication virale. APOBEC3G induirait également une meilleure reconnaissance des T CD4+ infectés par les CTL (Casartelli et al. 2010).
- La **téthérine/BST-2** possède une extrémité N-terminale transmembranaire et une extrémité C-terminale à ancre GPI. Cette topologie particulière lui permet d'ancrer le virion néoformé à la membrane plasmique de la cellule infectée et lui confère une activité antivirale à large spectre contre les virus enveloppés (Neil et al. 2008; Van Damme et al. 2008). Les virions retenus à la membrane sont ensuite internalisés puis dégradés via la voie de dégradation endo-lysosomale (Miyakawa et al. 2009; Perez-Caballero et al. 2009), ce qui enrichirait la source d'antigènes viraux présentés aux T CD8+ et T CD4+ (Colomer-Lluch et al. 2018).
- La protéine **TRIM-5 α** , qui appartient à la famille des E3 ligases TRIM, inhibe la réplication rétrovirale d'une manière espèce-spécifique en liant la capsidie rétrovirale, ce qui mène au déshabillage prématuré du complexe de rétro-transcription et perturbe sa translocation dans le noyau. Contrairement aux protéines TRIM-5 α des singes de l'ancien monde, la protéine TRIM-5 α humaine ne restreint pas le VIH-1 (Hatzioannou et al. 2004; Keckesova et al. 2004; Stremlau et al. 2004; Yap et al. 2004).
- La protéine **SAMHD1** échappe à l'antagonisme des protéines virales du VIH-1. L'infection par le VIH-1 est donc restreinte dans les cellules qui expriment SAMHD1 sous forme active phosphorylée telles que les DC et les monocytes (Hrecka et al. 2011; Laguette et al. 2011)

ainsi que les T CD4⁺ quiescents (Descours et al. 2012). Ces cellules sont qualifiées de **non permmissives** à l'infection par le VIH-1 (Colomer-Lluch et al. 2018). A l'inverse, SAMHD1 est exprimée sous forme non phosphorylée et inactive dans les lymphocytes T CD4⁺ activés, ainsi que dans certaines lignées cellulaires non hématopoiétiques (Hela, HEK 293T, Cos7) et certaines lignées lymphocytaires telles que les Jurkat. Ces cellules qui ne restreignent pas efficacement l'infection par le VIH-1 sont qualifiées de **permmissives** à l'infection par le VIH-1. SAMHD1 restreint principalement l'infection par le VIH-1 en hydrolysant les déoxynucléosides triphosphates (dNTP) par le biais de son activité phosphohydrolase, privant ainsi la TI de ses substrats. Cependant, il a été démontré que SAMHD1 exerçait également une activité ribonucléase importante pour la restriction de l'étape de transcription inverse (Ryoo et al. 2014).

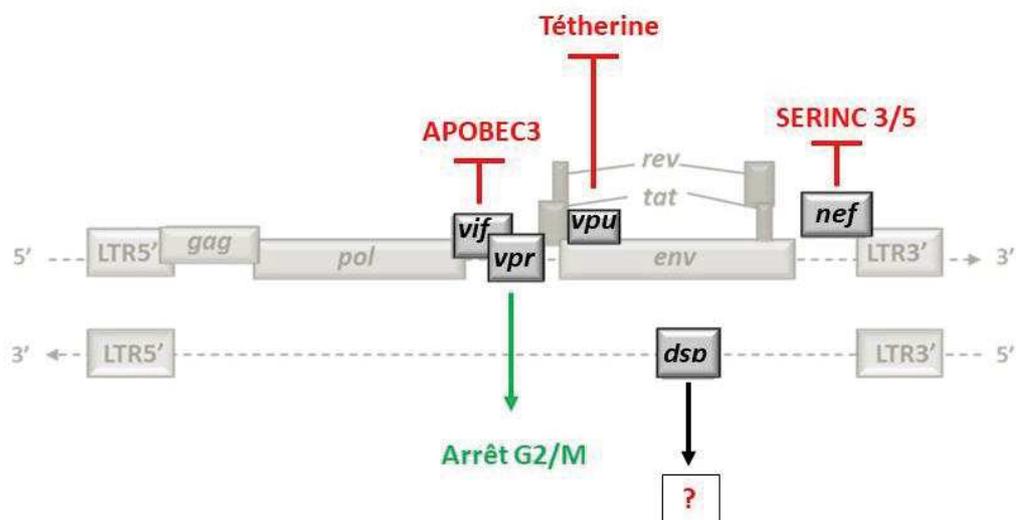


Figure 9 : Localisation génomique des gènes codant pour les protéines auxiliaires du VIH-1 et principales fonctions de ces protéines.

Outre APOBEC3G, tétherine/BST-2, SAMHD1 et TRIM-5 α , d'autres FR agissant à différentes étapes du cycle viral du VIH-1 ont été décrits. Les ubiquitines ligases MARCH 2 et 8 inhibent l'incorporation d'Env dans les particules virales néoformées (Tada et al. 2015), les protéines SERINC 3 et 5 et IFITMs inhibent l'entrée du VIH-1 dans la cellule (Lu et al. 2011; Usami et al. 2015), Schlafen 11 inhibe de manière sélective l'expression des protéines virales en perturbant le biais d'usage de codons de l'ARNt (Li et al. 2012), et MX-2 inhibe l'étape de transcription inverse (Goujon et al. 2013). Très récemment, l'équipe de Florence Margottin-Goguet a proposé l'existence d'un autre facteur de restriction, le complexe HUSH impliqué

dans la répression épigénétique de gènes cellulaires et contré par la protéine Vpx du VIH-2 (Chougui et al. 2018).

Fonctions des protéines auxiliaires du VIH-1

Le VIH-1 code pour 5 protéines qualifiées d'**auxiliaires** : Vif, Vpr, Nef, Vpu et ASP. Les protéines Vif, Vpr, Nef et Vpu sont toutes impliquées dans l'échappement du VIH-1 au système immunitaire de l'hôte, et contribuent donc au pouvoir infectieux du virus (Figure 9). Les hypothèses sur la fonction de la Protéine Antisens du VIH-1 (ASP), qui reste inconnue à ce jour, seront détaillées dans **la partie III2c de l'introduction**. Les principales fonctions des protéines Vif, Nef, Vpr et Vpu du VIH-1 ainsi que de la protéine Vpx du VIH-2 sont décrites ci-dessous.

Vif (Viral infectivity factor) est une petite protéine basique exprimée tardivement au cours de l'infection. La protéine Vif est impliquée dans différentes fonctions :

- ***L'antagonisme du facteur de restriction APOBEC3.*** La principale fonction de Vif est de contrer les protéines cellulaires appartenant à la famille des cytidines déaminases APOBEC3 (Sheehy et al. 2002) (Figure 9). L'encapsidation de Vif dans les particules virales néoformées (Khan et al. 2001) lui permet de contrer APOBEC3 lors de l'étape de transcription inverse, avant même que l'ARNm de Vif ne soit traduit. En l'absence de Vif, ces protéines sont incorporées dans la particule virale néoformée. Vif inhibe l'encapsidation des protéines APOBEC3 lors de l'assemblage de la particule virale en recrutant une ubiquitine ligase cellulaire, ce qui induit la dégradation protéasomale des protéines APOBEC3 (Marin et al. 2003; Sheehy et al. 2003; Yu et al. 2003).
- ***L'initiation de la transcription inverse et la stabilisation de la nucléocapside.*** Il a été suggéré que l'encapsidation de Vif permettait de stabiliser la nucléocapside et la transcriptase inverse (Ohagen et Gabuzda 2000). Par ailleurs, l'utilisation de virus dépourvus du gène *vif* (Δvif) a permis de démontrer une déficience dans l'initiation de la transcription inverse en l'absence de Vif (Dettenhofer et al. 2000; Carr et al. 2006).
- ***L'inhibition de l'autophagie dans les cellules infectées.*** Une étude a rapporté que Vif inhibait l'autophagie dans les cellules infectées en interagissant avec la protéine pro-LC3 (Borel et al. 2015).

Vpu (Viral protein u) est une protéine transmembranaire exprimée tardivement au cours du cycle viral. Diverses fonctions sont associées à Vpu :

- ***L'antagonisme du facteur de restriction tétherine/BST-2.*** Vingt ans après sa découverte (Strebel et al. 1988), le facteur de restriction Tétherine/BST-2 a été identifié comme la cible cellulaire de Vpu (Neil et al. 2008) (Figure 9). Vpu antagonise BST-2 en (i) induisant sa dégradation protéasomale, en (ii) diminuant sa concentration à la surface de la cellule et en (iii) induisant la dégradation des virions par voie endo-lysosomale (Van Damme et al. 2008; Mangeat et al. 2009; Iwabu et al. 2010).
- ***La diminution de l'expression de CD4 et NTB-A à la membrane plasmique de la cellule infectée.*** Vpu régule de manière négative l'expression à la membrane plasmique de CD4 (Sauter et al. 2009) et de NTB-A, une molécule de co-stimulation requise pour l'activation des cellules Natural Killer (NK) (Shah et al. 2010).
- ***L'inhibition de la voie de signalisation de NF- κ B.*** Vpu inhibe la voie de signalisation de NF- κ B via un mécanisme qui implique la stabilisation de I κ B, le complexe inhibiteur de NF- κ B, et la diminution de la translocation nucléaire de la sous-unité p65 de NF- κ B (Sauter et al. 2015). Cette inhibition de la voie NF- κ B permettrait d'inhiber la transcription virale dépendante de NF- κ B des gènes stimulés par l'interféron de type I.

Nef (Negative factor) est une petite protéine produite précocement au cours de l'infection. Les études initiales visant à élucider le rôle de Nef ont suggéré qu'elle était capable d'atténuer la réplication virale, d'où son nom de *Negative Factor* (Luciw et al. 1987). Cependant, dès 1989, ce rôle a été controversé, et il est maintenant établi que Nef stimule la réplication virale en interagissant avec un grand nombre de partenaires cellulaires et en perturbant le métabolisme des cellules infectées. Les fonctions suivantes sont associées à Nef:

- ***La modulation du niveau d'expression de récepteurs cellulaires à la membrane plasmique de la cellule infectée.*** La première fonction de Nef qui a été mise en évidence est sa capacité à diminuer le niveau de CD4 à la surface des cellules infectées (Guy et al. 1987), selon un mécanisme d'endocytose de CD4 et d'orientation vers la voie de dégradation lysosomale. Nef diminue également l'expression de la molécule co-réceptrice CD28, des corécepteurs CXCR4 et CCR5 et des molécules du CMH de type I et II matures à la surface des cellules infectées (Schwartz et al. 1996; Hrecka et al. 2005; Michel et al. 2005; Chaudhry et al. 2009).

A l'inverse, Nef augmente l'expression membranaire du CMH-II immature et de la lectine DC-SIGN (Stumptner-Cuvelette et al. 2001; Sol-Foulon et al. 2002). La diminution de l'expression de CD4 et des corécepteurs CCR5 et CXCR4 permet d'éviter une surinfection de la cellule qui serait délétère pour le bourgeonnement du virus néoformé (Lama et al. 1999), tandis que la régulation négative de l'expression des molécules de CMH de type I et II permet au virus d'échapper au système immunitaire de l'hôte.

- **L'antagonisme du facteur de restriction SERINC 3-5.** Nef augmente le pouvoir infectieux des particules virales : les virus Δnef sont moins pathogènes que les virus sauvages (Aiken et Trono 1995; Garcia et Foster 1996; Bertsch et al. 2002). Les mécanismes moléculaires à l'origine de cette observation ont été récemment élucidés par la découverte de deux facteurs de restriction contrôlés par Nef : SERINC 3 et -5 (Rosa et al. 2015; Usami et al. 2015) (Figure 9). Nef diminue l'expression de SERINC 3 et 5 à la membrane plasmique en les relocalisant dans un compartiment endosomal (Shi et al. 2018). L'antagonisme des protéines SERINC est considéré comme la plus importante contribution de Nef au pouvoir infectieux du virus.
- **L'activation de la transcription virale.** L'ARN messager de Nef est parmi les premiers transcrits viraux à être traduits. En conséquence, Nef est exprimée très tôt au cours de l'infection, et certaines études suggèrent que Nef possède la capacité d'activer la transcription des gènes viraux en activant les voies de signalisation des facteurs de transcription NF- κ B et NFAT qui se lient à la région *enhancer* du LTR (Figure 6C) (Sauter et al. 2015). L'activation de la transcription des gènes viraux par Nef contribuerait à initier la boucle de régulation positive de Tat.

Nef est incorporée dans les particules virales et subit un clivage par la protéase du VIH-1 au cours de la maturation du virus. Une étude menée par Laguette et al. a démontré que les virions pour lesquels l'incorporation de Nef était "forcée" présentaient un pouvoir infectieux similaire aux virus Δnef (Laguette et al. 2009), ce qui suggère que l'incorporation de Nef n'augmente pas le pouvoir infectieux du virus. Le rôle de l'incorporation de Nef dans la particule virale néoformée est encore inconnu.

La protéine Vpr (**Viral protein r**) de certains VIS dépourvus du gène *vpx* est capable de contrer le facteur de restriction SAMHD1 (Lim et al. 2012). Cependant, chez le VIH-1 et ses précurseurs VIS cpz et VIS gor, **aucun facteur de restriction contrôlé par la protéine Vpr n'a été décrit**. Plusieurs fonctions sont associées à Vpr :

- ***L'activation de la transcription virale et l'import nucléaire du complexe de rétro-transcription (RTC).*** Tout comme Nef et Vif, Vpr est incorporée dans la particule virale néoformée, via son interaction avec le domaine p6 de Gag (Cohen et al. 1990; Yuan et al. 1990; Paxton et al. 1993). Son encapsidation lui permet d'assurer des fonctions à des stades précoces du cycle viral. En effet, Vpr a été décrit comme un régulateur positif de la transcription virale, via son interaction avec différents facteurs d'initiation de la transcription tels que SP1, TFIIB ou encore p300 (Wang et al. 1995; Agostini et al. 1996; Felzien et al. 1998). Par ailleurs, une étude a suggéré l'implication de Vpr dans l'import nucléaire du RTC par le biais de son interaction avec l'importine- α (Kamata et al. 2005).
- ***L'arrêt du cycle cellulaire en phase G2/M des cellules infectées en division.*** Dans les cellules en division, Vpr induit une réponse de dommages à l'ADN ATR-dépendante qui résulte en un arrêt du cycle cellulaire en phase G2/M (Di Marzio et al. 1995; Roshal et al. 2003) (Figure 9). Laguette et al. ont proposé un modèle selon lequel Vpr induirait l'arrêt de la cellule en phase G2/M en activant prématurément le complexe de réparation à l'ADN SLX4 (Laguette et al. 2014). Cependant, une étude récente a démontré que l'arrêt du cycle cellulaire était induit par Vpr même en l'absence de l'expression de SLX4 (Fregoso et Emerman 2016). Les mécanismes moléculaires qui sous-tendent l'arrêt du cycle cellulaire en phase G2/M induit par Vpr restent donc controversés. Dans tous les cas, l'arrêt en phase G2/M serait avantageux pour la transcription virale, car le LTR du VIH-1 a été décrit pour être plus actif au cours de cette phase du cycle cellulaire (Goh et al. 1998). De plus, une étude a rapporté une diminution de l'activité transcriptionnelle du LTR du VIH-1 dans des DC lorsque le domaine de Vpr impliqué dans l'arrêt du cycle cellulaire est muté (Miller et al. 2017).
- ***Vpr comme toxine virale extracellulaire.*** Vpr peut accéder au compartiment extracellulaire où elle est présente sous forme soluble. A l'heure actuelle, on ignore si Vpr est sécrétée par les cellules infectées ou relarguée de manière passive (Ferrucci et al. 2011). La présence de Vpr dans le sérum et le fluide cérospinal de patients infectés par le VIH-1 a initialement été rapportée par deux études (Levy et al. 1994, 1995). Plus récemment, une étude a rapporté la présence de Vpr associée à des vésicules extracellulaires dans l'urine de patients infectés par le VIH-1 (Anyanwu et al. 2018). La concentration en Vpr dans le plasma de patients infectés, estimée à 5-10 ng/ μ L, est proportionnelle à la charge virale (Hoshino et al. 2007). Vpr extracellulaire peut être internalisée par différents types cellulaires (Henklein et al. 2000), ce qui résulte en un phénotype pro- ou anti-apoptotique, selon la concentration intracellulaire de Vpr et sa localisation subcellulaire (Ferrucci et al. 2011). Par ailleurs,

l'étude pionnière conduite par Levy et al. a suggéré la capacité de Vpr extracellulaire à augmenter la réplication virale dans les PBMC de patients (Levy et al. 1994). Dans le système nerveux central, l'internalisation de Vpr par les neurones altère leur fonction et induit leur mort cellulaire (Piller et al. 1996; Jones et al. 2007).

La protéine Vpx (**Viral protein x**) est produite par le VIS sm et son descendant VIH-2, ainsi que par le VIS du *red-capped mangabey* (VIS rcm) précurseur du VIS cpz. Le gène *vpx*, qui est issu de la duplication ancestrale du gène *vpr*, a été perdu lors de la diversification de la lignée VIS rcm en VIS cpz (Etienne et al. 2013b). Par conséquent, le gène *vpx* est absent du génome du VIH-1, descendant du VIS cpz. Bien que Vpx ne soit pas produite par le VIH-1, la découverte de sa fonction principale a permis une avancée considérable dans la compréhension de la résistance de certains types cellulaires (macrophages, DC, T CD4+ quiescents) à l'infection par le VIH-1. Pour cette raison, j'ai choisi d'évoquer ses principales fonctions, qui sont :

- ***L'antagonisme du facteur de restriction SAMHD1.*** La capacité de Vpx à lever la restriction imposée par des facteurs cellulaires dans les DC et les macrophages a été suggérée bien avant l'identification du facteur de restriction SAMHD1 (Mangeot et al. 2002; Goujon et al. 2006). En 2011 et 2012, SAMHD1 a été identifié comme la cible cellulaire principale de Vpx dans les DC et les cellules myéloïdes (Hrecka et al. 2011; Laguette et al. 2011; Lahouassa et al. 2012), puis dans les T CD4+ quiescents (Descours et al. 2012). Ces études ont démontré que Vpx contrait l'effet antiviral de SAMHD1 en induisant sa dégradation protéasomale. Bien que l'antagonisme de SAMHD1 soit considéré comme la fonction principale de Vpx, Lim et al ont rapporté une activité similaire pour la protéine Vpr de différentes lignées de VIS qui ne possède pas le gène *vpx* (Lim et al. 2012).
- ***L'Inhibition de la répression épigénétique des gènes proviraux par l'antagonisme du complexe HUSH.*** Récemment, l'équipe de Florence Margottin-Goguet a démontré que la protéine Vpx de différentes lignées de VIS et du VIH-2 exerçait un rôle pro-viral indépendant de SAMHD1, en induisant la dégradation protéasomale du complexe HUSH impliqué dans la répression épigénétique de gènes cellulaires (Chougui et al. 2018). Chougui et al. ont argumenté que l'antagonisme de HUSH par Vpx favorisait l'expression des gènes proviraux en diminuant la répression épigénétique du génome proviral. Cette étude a également rapporté la capacité de la protéine Vpr de différentes lignées de VIS (mais pas du VIH-1) à dégrader le complexe HUSH.

e. Cycle viral et réplication

Le cycle viral du VIH-1 peut être subdivisé en **phases précoces** (de l'entrée du virus dans la cellule hôte à l'intégration de l'ADN viral au génome de la cellule hôte) et en **phases tardives** (de la production des transcrits viraux à la néoformation de particules virales). Les principales étapes de ces deux phases sont décrites ci-dessous (Figure 10).

Phases précoces du cycle viral

- 1. Entrée du VIH-1 dans la cellule hôte : fusion entre l'enveloppe virale et la membrane plasmique.** Lorsque le virus approche de la cellule cible, gp120 se lie au récepteur CD4, ce qui entraîne une série de réarrangements des régions variables V1, V2 et V3 de gp120 et la liaison du corécepteur de la cellule (CCR5 ou CXCR4) à gp120. L'engagement du corécepteur permet de démasquer le peptide de fusion de la sous-unité gp41, qui s'insère alors dans la membrane plasmique de la cellule cible. L'insertion du peptide de fusion ancre le virus à la surface de la cellule cible et induit la formation d'un pore de fusion au travers duquel la capsid virale est injectée dans le cytoplasme.
- 2. Déshabillage du complexe de rétro-transcription.** L'étape de transcription inverse chez le VIH-1 est initiée au sein d'un complexe nucléo-protéique nommé le complexe de **Rétro-transcription (RTC)**. Au sein de ce complexe, l'ARN génomique est protégé par des protéines virales pendant que la TI le reverse-transcrit en ADN double brin. Le RTC comprend la TI, l'intégrase et les protéines Vpr et Vif. La capsid protège le génome viral de la dégradation par les endonucléases cellulaires, et prévient sa détection par le système immunitaire. L'étape du cycle viral à laquelle a lieu le déshabillage du RTC est encore source de débats, mais plusieurs études ont suggéré que le déshabillage avait lieu au niveau du pore nucléaire (Dismuke et Aiken 2006; Arhel 2010; Krishnan et al. 2010; Di Nunzio et al. 2012).

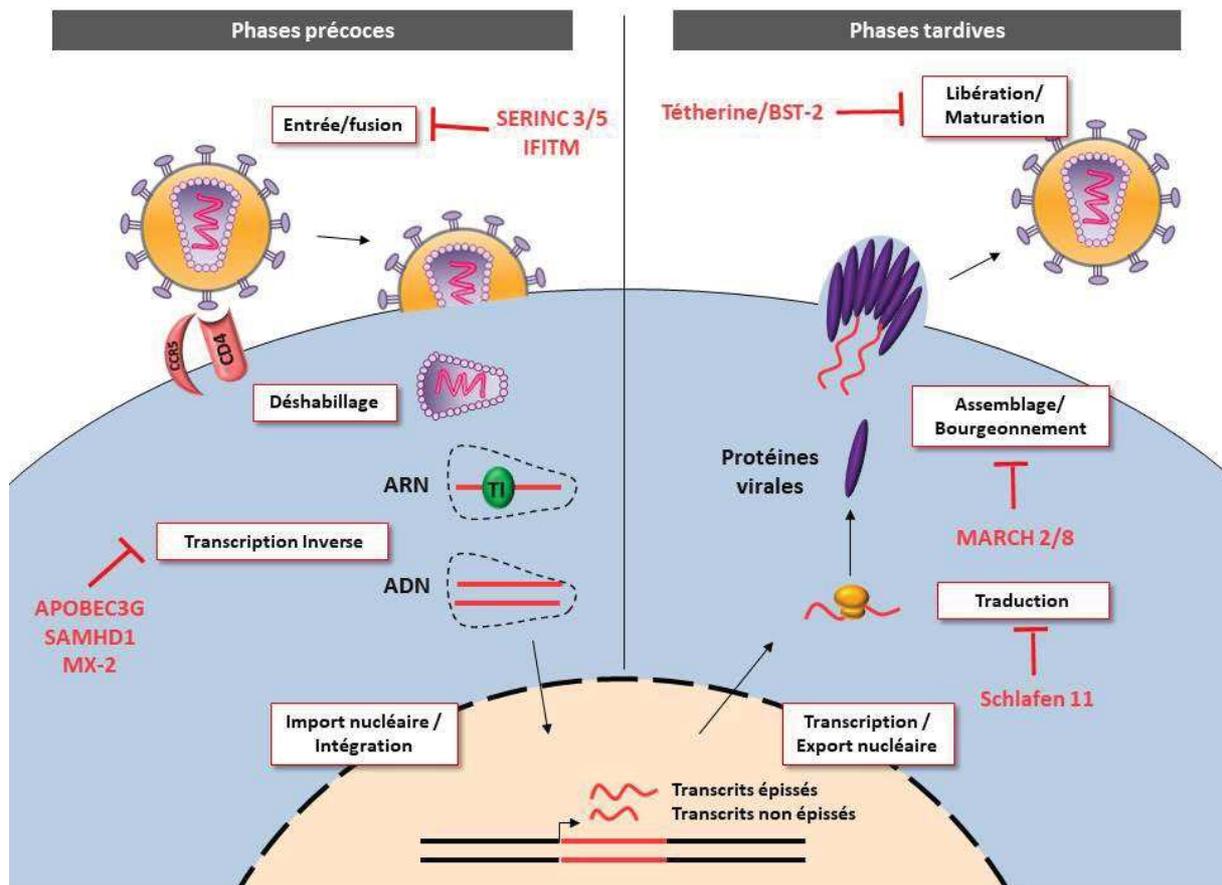


Figure 10 : Acteurs cellulaires et viraux des phases précoces et tardives du cycle viral du VIH-1. Les facteurs de restriction cellulaires inhibant les différentes étapes du cycle viral du VIH-1 sont représentés. TI : Transcriptase Inverse.

3. Transcription inverse. Durant cette étape, l'ARN génomique viral est rétro-transcrit en ADN double brin. L'étape de transcription inverse est catalysée par la TI, et fait intervenir deux amorces différentes pour la synthèse de chaque brin d'ADN viral. La transcription inverse comporte plusieurs étapes :

- **L'initiation.** La transcription inverse est initiée par l'hybridation d'un ARN de transfert de la lysine (ARNt Lys) à l'extrémité 5' de l'ARN génomique, au niveau du site de liaison de l'amorce (PBS). L'activité polymérase de la TI synthétise un petit fragment d'ADN complémentaire à l'extrémité 5' de l'ARN génomique. Ce brin est nommé brin d'ADN "*minus strong stop*".
- **Premier transfert de brin.** Le brin "*minus strong stop*" est transféré à l'extrémité 3' de l'ARN génomique matrice, où il s'hybride à la région R complémentaire. La TI catalyse

l'élongation du brin "*minus strong stop*" jusqu'à l'extrémité 5' du génome viral. De manière concomitante, l'activité RNase H de la TI dégrade l'ARN matrice au sein de l'hétérduplexe ARN/ADN.

- **Synthèse du deuxième brin d'ADN.** Deux séquences de l'ARN génomique résistent à l'activité RNase H : il s'agit de séquences riches en purines (PPT pour *polypurine tract*). Ces deux séquences servent d'amorce à la synthèse du deuxième brin d'ADN, nommé brin "*strong stop*".
- **Deuxième transfert de brin.** Le brin "*strong stop*" est transféré à l'extrémité 5' du brin d'ADN matrice auquel il s'hybride au niveau de la région PBS.
- **Elongation et formation de l'ADN double brin.** L'activité polymérase de la TI procède à l'élongation du deuxième brin et des extrémités 5' et 3' du premier brin d'ADN.

A l'issue de la transcription inverse, le génome viral est composé de deux brins d'ADN complémentaires bordés de deux séquences promotrices identiques : les LTR. Le génome viral est prêt à être intégré à l'ADN de la cellule hôte : on parle alors de **complexe de pré-intégration (PIC)** et non plus de complexe de rétro-transcription.

4. Import nucléaire. Le génome du VIH-1 nécessite un transport actif à travers le pore nucléaire pour atteindre l'ADN génomique de la cellule hôte. Les mécanismes moléculaires impliqués dans le passage du PIC à travers le pore nucléaire sont toujours l'objet de recherches. Les études réalisées dans ce domaine suggèrent néanmoins l'implication des protéines de capsid dans l'import nucléaire (Krishnan et al. 2010; Schaller et al. 2011; Di Nunzio et al. 2012).

5. Intégration à l'ADN de la cellule hôte. L'intégration de l'ADN viral à la cellule hôte est catalysée par l'intégrase du VIH-1, selon une réaction en deux temps. Avant l'import du PIC dans le noyau, l'intégrase s'oligomérisse au niveau du LTR de l'ADN viral, et clive deux nucléotides à chaque extrémité 3', ce qui génère deux groupement hydroxyls réactifs. Après l'import nucléaire du PIC, l'intégrase se fixe à l'ADN viral double brin et catalyse l'attaque nucléophile des extrémités 3'-OH de l'ADN viral sur la liaison phosphodiester de l'ADN de la cellule hôte. La machinerie cellulaire de réparation des dommages à l'ADN répare ensuite les deux cassures simples brin causées dans l'ADN cellulaire par l'attaque nucléophile de l'ADN viral, ce qui termine le processus d'intégration. L'ADN viral intégré au génome de la cellule hôte est qualifié d'**ADN proviral**. Plusieurs études ont rapporté que l'intégration

de l'ADN viral au sein du génome de la cellule hôte était non aléatoire, et se faisait préférentiellement dans les introns des gènes transcriptionnellement actifs (Schröder et al. 2002; Han et al. 2004; Lewinski et al. 2006; Sowd et al. 2016).

Phases tardives du cycle viral

1. Transcription du génome viral et export nucléaire. La transcription des gènes localisés sur le brin sens du génome proviral est initiée à partir du promoteur situé dans le LTR 5'. La transcription est initiée par la liaison du facteur d'initiation TFIID à la TATA box et par le recrutement des facteurs de transcription SP1 et NF- κ B au niveau de leurs sites de liaison respectifs. De plus, le facteur de restriction NF- κ B recrute des histones acétyl-transférases au niveau du promoteur, ce qui enlève la restriction imposée par la structure de la chromatine au niveau du promoteur. La polymérase II de la cellule hôte est recrutée au niveau du promoteur et marque une pause au niveau du TAR. Le complexe Tat/pTEF-b se fixe au TAR et la cycline CDK9 phosphoryle l'extrémité C-terminale de la polymérase II, ce qui entraîne l'élongation de la transcription des gènes viraux en transcrits complètement épissés, mono-épissés et non épissés. Les transcrits non épissés et mono-épissés comportent la séquence RRE et sont exportés hors du noyau de manière dépendante de Rev.

2. Assemblage des particules virales. L'assemblage de la particule virale commence par la synthèse de la polyprotéine Pr55Gag et sa translocation à la membrane plasmique, où elle interagit avec l'ARN génomique.

- **Recrutement et assemblage de Pr55Gag à la membrane plasmique.** La particule virale s'assemble au niveau du feuillet interne de la membrane plasmique. Cet assemblage requiert l'ancrage de Pr55Gag à la membrane plasmique par le biais de la myristoylation de son domaine Matrice, et l'oligomérisation de Pr55Gag médiée par ses domaines Matrice et NC (Göttlinger et al. 1989; Burniston et al. 1999).
- **Encapsidation de l'ARN génomique.** Après leur export dans le cytoplasme, les ARNm viraux sont traduits en protéines. Une partie de l'ARN génomique est traduite en protéines, et l'autre partie est incorporée dans les particules virales néoformées. Deux copies d'ARN génomique sont incorporées dans chaque particule virale, ce qui favorise les événements de recombinaison lors de la transcription inverse et permet la réalisation de cette étape même si l'une des deux copies d'ARN génomique est défectueuse. L'encapsidation de l'ARN génomique est initiée par l'interaction du domaine

Nucléocapside (NC) de Pr55Gag avec le signal d'incorporation ϕ situé en 5' de l'ARN génomique.

- **Assemblage de la particule virale immature.** A la membrane plasmique, les précurseurs Pr55Gag, Pr160Gag-pol et l'ARN génomique s'assemblent pour former une particule virale immature.
- **Incorporation de Env.** Les mécanismes impliqués dans l'incorporation de la protéine Env dans l'enveloppe de la particule virale ne sont pas complètement connus, mais une étude suggère que cette étape nécessite l'interaction entre le domaine Matrice (MA) de Pr55Gag et le domaine cytoplasmique de gp41 (Murakami et Freed 2000).

3. *Bourgeonnement et libération des particules virales néoformées.*

- **Libération des virions.** Cette étape fait intervenir la machinerie ESCRT (*Endosomal Sorting Complex Required for Transport*). Les mécanismes à l'origine du recrutement du complexe ESCRT au site du bourgeonnement de la particule virale ne sont pas totalement élucidés, mais des études ont démontré que le motif PTAP du domaine p6 de Pr55Gag (Huang et al. 1995) et l'ubiquitination de Pr55Gag étaient impliqués dans cette étape (Sette et al. 2013). La scission de la membrane plasmique est induite par la polymérisation de la protéine ESCRT III au site du bourgeonnement viral et par l'activité de l'ATPase VPS4.
- **Maturation de la particule virale.** Les particules virales sont libérées sous forme immature. Leur maturation, qui est nécessaire à l'acquisition de leur pouvoir infectieux, est acquise suite au clivage des polyprotéines Pr55Gag et Pr55GagPol par la protéase virale, ce qui induit un réarrangement morphologique du virus. A l'issue du clivage, les protéines de Capside s'assemblent pour former une structure interne conique caractéristique : la capside virale.

4. Le VIH-1 du groupe M : quels facteurs sont associés à sa propagation pandémique ?

Contrairement au groupe M, les groupes O, N et P ont connu une expansion limitée. La clé du succès pandémique du groupe M reste méconnue, et les études comparatives de la capacité de transmission des virus des 4 groupes du VIH-1 sont rendues difficiles par la multiplicité des facteurs (ethniques, sociologiques, immunologiques) qui concourent à l'efficacité de

transmission du virus à l'échelle de la population. Cependant, il est aujourd'hui communément accepté que la diffusion pandémique du groupe M est le fruit combiné de facteurs moléculaires intrinsèques au groupe M et de facteurs épidémiologiques et socio-démographiques.

a. Facteurs épidémiologiques et socio-démographiques

Les outils de datation moléculaire et les études évolutives menées par l'équipe du Pr Delaporte ont permis de retracer l'histoire de la pandémie du groupe M du VIH-1 (Etienne et Peeters 2010; Faria et al. 2014). L'ancêtre commun le plus récent du groupe M a été évalué à 1908, et l'épicentre de la pandémie a été localisé à Kinshasa, en RDC (Faria et al. 2014) (Figure 11A et B). De Kinshasa, le virus se serait propagé aux trois autres principales villes de RDC connectées entre elles par des voies fluviales et ferroviaires (Figure 11B). Le VIH-1 du groupe M est resté endémique en RDC jusqu'à l'arrivée dans les années 1960 de travailleurs Haïtiens dans le nouveau Congo indépendant. Le virus a par la suite été introduit en Haïti lors du retour des travailleurs Haïtiens contaminés, vers 1966 (Figure 11A), avant de se propager en Amérique du Nord aux alentours de 1969, soit environ 12 ans avant la reconnaissance des cas d'immunodépression à San Francisco. Des études évolutives suggèrent fortement que le sous-type B du groupe M a été introduit d'Haïti en Amérique du Nord à cette période (Gilbert et al. 2007; Junqueira et Almeida 2016; Worobey et al. 2016). L'émigration des Haïtiens vers les Etats-Unis et le tourisme sexuel en Haïti ont probablement joué un rôle crucial dans l'introduction du VIH-1 en Amérique du Nord. De l'Amérique du Nord, le virus a ensuite connu une expansion pandémique.

Les contextes socio-économiques et démographiques en RDC, en Haïti et aux Etats-Unis ont joué un rôle déterminant dans la propagation du groupe M du VIH-1. En RDC en particulier, l'augmentation de la densité de population dans les zones forestières, le décuplement des moyens de transport entre les zones rurales et urbaines et l'augmentation du tourisme sexuel ont constitué un terrain favorable à la naissance d'une épidémie à partir d'une émergence virale au départ isolée.

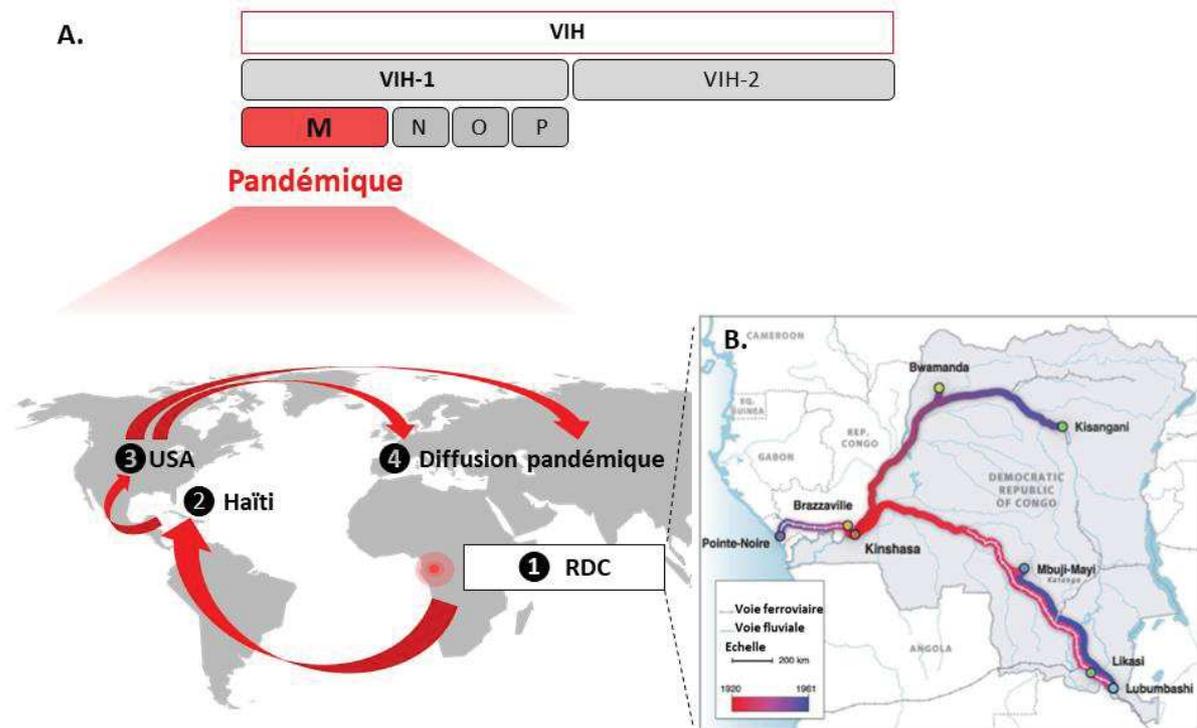


Figure 11: Historique de la propagation pandémique du groupe M du VIH-1. A. Le groupe M s’est propagé de RDC à Haïti, puis d’Haïti en Amérique du Nord, et enfin au reste du monde. B. Propagation du VIH-1 du groupe M de Kinshasa aux trois principales villes de RDC (Faria et al. 2014).

b. Facteurs moléculaires intrinsèques au groupe M

Les virus infectant les animaux ne sont pas tous efficacement transmis à l’Homme. La **transmission efficace** d’un virus d’un animal à l’Homme nécessite de franchir la barrière inter-espèce et de s’adapter au nouvel hôte, mais également de se diffuser dans la nouvelle population. **La transmission d’un virus à une nouvelle espèce n’induit pas nécessairement sa diffusion dans la nouvelle population.** Le VIH-1 en offre un exemple frappant : le VIH-1 du groupe M est devenu pandémique tandis que le VIH-1 des groupes N et P n’ont infecté qu’une poignée d’individus. La diffusion d’un virus au sein de la nouvelle population après un événement de franchissement de barrière d’espèce résulte d’une combinaison de facteurs viraux et environnementaux favorables. Bien que la contribution de facteurs moléculaires intrinsèques à la diffusion pandémique du groupe M reste débattue, quelques études ont observé des différences dans certains mécanismes moléculaires du cycle viral des groupes M, O, N et P.

Pouvoir répliatif du groupe M

Une étude réalisée sur des cellules primaires infectées *in vitro* a rapporté la capacité supérieure d'isolats du groupe M du VIH-1 à se répliquer et à être transmis des DC aux T CD4⁺, par rapport à des isolats du groupe O et du VIH-2 (Ariën et al. 2005). Bien que réalisée sur des modèles cellulaires *in vitro*, cette étude questionne sur la nature des déterminants viraux qui gouvernent les potentielles capacités de répliation et de transmission supérieures du virus du groupe M.

Antagonisme de BST-2

La restriction imposée par BST-2 (**voir partie I3d de l'introduction**) ne se limite pas à l'ancrage des virions à la membrane plasmique. En effet, l'accumulation de virions à la membrane plasmique de la cellule infectée induit l'activation de la voie de signalisation NF-κB dans la cellule (Galão et al. 2012; Tokarev et al. 2013) et favorise sa lyse par le phénomène de cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps (ADCC) (Arias et al. 2014). Par ses multiples activités antivirales, BST-2 a façonné l'évolution des VIS et du VIH-1 chez les primates, qui ont évolué trois protéines virales différentes pour la contrer. Pour la plupart des VIS, l'antagonisme de BST-2 est exercé par la protéine Nef (Jia et al. 2009; Sauter et al. 2009; Zhang et al. 2009). En revanche, la protéine BST-2 humaine est résistante au blocage induit par Nef. Tandis que le VIH-2 a évolué ses protéines d'**enveloppe** pour contrer BST-2 (Le Tortorec et Neil 2009), cette fonction est exercée par Vpu chez le **groupe M du VIH-1**, et par Nef chez le **groupe O du VIH-1**.

Il existe deux isoformes de BST-2 qui diffèrent par la longueur de leur extrémité N-terminale cytoplasmique. Seule l'isoforme longue a été associée à l'activation de la voie de signalisation de NF-κB dans la cellule infectée (Cocka et Bates 2012; Weinelt et Neil 2014). Vpu emploie deux mécanismes différents pour contrer les isoformes courte et longue de BST-2 :

- La diminution de l'expression de l'**isoforme longue** de BST-2 à la membrane plasmique, ce qui inhibe l'activation de la voie NF-κB (Sauter et al. 2015).
- Le déplacement de l'**isoforme courte** de BST-2 du site d'assemblage viral (McNatt et al. 2013; Lewinski et al. 2015). Ce déplacement promeut l'interaction de l'isoforme courte de BST-2 avec le récepteur ILT7 des pDC. La liaison de BST-2 à ILT7, un régulateur de l'immunité innée, inhibe la production d'IFN de type I et de cytokines pro-inflammatoires par les pDC (Bego et al. 2015).

Contrairement à la protéine Vpu du groupe M, la protéine Nef du groupe O ne contre pas l'isoforme courte de BST-2 et n'inhibe donc pas la production d'IFN de type I par les pDC (Bego et al. 2015). Bego et al. ont ainsi suggéré que **les différences d'antagonisme de BST-2 par les protéines Vpu du groupe M et Nef du groupe O** pouvaient en partie expliquer la plus faible propagation du groupe O dans la population.

Conservation unique du gène codant pour ASP dans le groupe M du VIH-1

Notre équipe a récemment démontré **l'émergence concomitante** et la **conservation unique** du gène codant pour ASP dans le groupe M, ainsi que l'existence d'une **pression de sélection** positive permettant le maintien de ce gène au sein du groupe M (Cassan et al. 2016). Cette étude, que je détaillerai dans la partie III de l'introduction, **suggère fortement que les produits du gène *asp* confèrent un avantage évolutif au groupe M qui aurait contribué à sa propagation pandémique.**

Les VIH-1 et -2 résultent de la transmission inter-espèce du VIS des PNH d'Afrique à l'Homme. Parmi les différents groupes phylogénétiques du VIH, seul le groupe M du VIH-1 a connu une expansion rapide et pandémique. Cette expansion est probablement le fruit de plusieurs facteurs : des facteurs socio-démographiques bien documentés, mais également des facteurs intrinsèques au VIH-1 du groupe M encore méconnus. La découverte de l'unique conservation du gène *asp* au sein du groupe pandémique M du VIH-1 suggère que ce gène ou les produits de ce gène ont contribué à l'établissement de la pandémie. **L'étude du rôle des transcrits du gène *asp* et de la protéine ASP pourrait donc contribuer à la compréhension de l'établissement de la pandémie et à la prévention de la diffusion du VIH-1 dans la population.**

II. Immunopathologie de l'infection par le VIH-1

L'infection par le VIH-1 induit une série d'évènements complexes chez l'hôte, qui en l'absence de traitement mènent ultimement au Syndrome de l'Immuno-Déficience Acquise (SIDA). En effet, le système immunitaire des individus non traités se révèle souvent inefficace à long terme, à l'exception d'une poignée d'individus qui possèdent la capacité de contrôler spontanément la réplication virale. Il est maintenant bien établi que le VIH-1 est présent sous forme latente dans une fraction des cellules infectées, qualifiées de réservoir. L'établissement de ce réservoir viral dès les stades précoces de l'infection, l'incroyable diversité génétique du virus et la méconnaissance des réponses immunitaires requises pour induire une protection immunitaire efficace constituent les 3 principaux freins à l'éradication du virus et à l'élaboration d'une stratégie thérapeutique. Toutefois, les thérapies antirétrovirales actuelles permettent, à défaut d'éradiquer le virus, de contrôler la réplication virale chez la plupart des patients. Dans cette partie, je résume (i) les différentes phases de l'infection naturelle par le VIH-1, y compris l'établissement des réservoirs latents, (ii) l'impact de l'infection sur le système immunitaire avec un accent particulier sur la réponse anticorps, et (iii) les traitements actuels ainsi que les thérapies émergentes.

1. Histoire naturelle de l'infection par le VIH-1

a. Tropisme et cibles cellulaires du VIH-1

L'infection des cellules cibles du VIH-1 requiert la liaison de la glycoprotéine gp120 à son récepteur primaire, la protéine CD4 présente à la surface des cellules infectées (Dalglish et al. 1984). La liaison de la gp120 au CD4 induit une série de changements conformationnels de la gp120 qui lui permettent de lier ses co-récepteurs CCR5 ou CXCR4 (Asjö et al. 1986; Feng et al. 1995; Alkhatib et al. 1996) (Figure 12). La capacité du virus à lier l'un ou l'autre de ces corécepteurs définit son **tropisme cellulaire**. L'infection d'un individu est souvent le fruit d'un virus à tropisme CCR5 (R5) qualifié de virus fondateur ou *Transmitter Founder* (Deng et al. 1996; Keele et al. 2008; Joseph et al. 2015b), mais le virus peut subir au cours de l'infection un changement phénotypique résultant en un tropisme CXCR4 (X4). La proportion d'individus qui exhibent un changement de tropisme viral au cours de leur infection varie en fonction des sous-types, et est d'environ 50% pour les individus infectés par un virus de sous-type B (Connor

1995; Regoes et Bonhoeffer 2005). L'apparition de virus X4 a été associée à une rapide progression de la maladie et à un déclin plus prononcé du taux de T CD4+ (Connor 1995; Regoes et Bonhoeffer 2005).

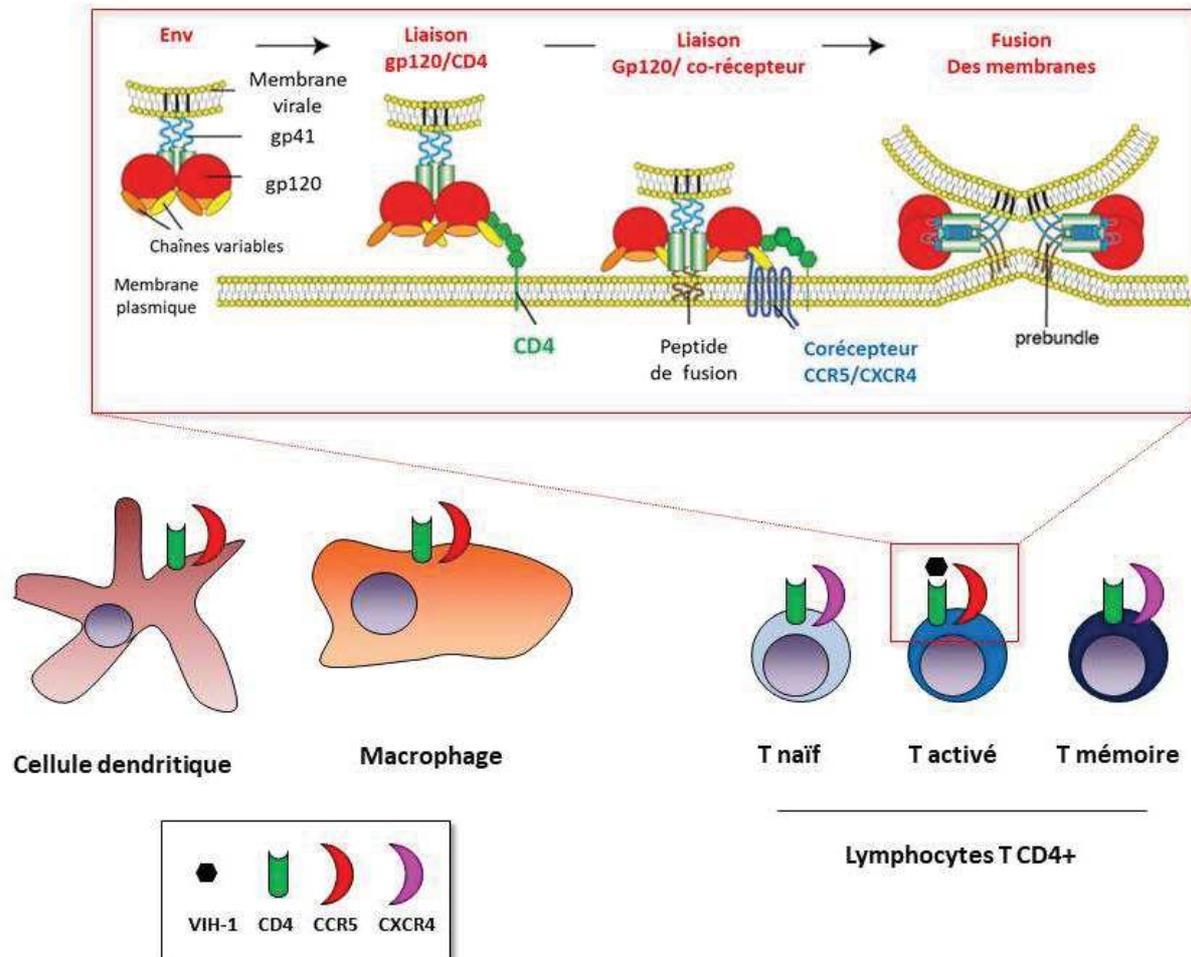


Figure 12 : L'usage des corécepteurs du VIH-1 (CCR5/CXCR4) définit ses principales cibles cellulaires. Les étapes d'entrée du virus dans les cellules cibles qui font intervenir le récepteur CD4 et les co-récepteurs CCR5/CXCR4 sont décrites (Didigu et Doms 2012).

L'usage du récepteur CD4 et de l'un ou l'autre des co-récepteurs CCR5 ou CXCR4 définit le spectre des types cellulaires que le VIH-1 peut infecter (Figure 12). Ainsi, les virus à tropisme R5 peuvent infecter les lymphocytes T CD4+ activés, les monocytes, les macrophages et les cellules dendritiques qui possèdent le co-récepteur CCR5 à leur surface. Les virus à tropisme X4 possèdent quant à eux la capacité d'infecter les T CD4+ naïfs et mémoires qui expriment le co-récepteur CXCR4, ce qui a été avancé comme l'un des facteurs à l'origine de la progression plus rapide de la maladie observée avec les virus X4. La capacité des virus X4 à induire la mort

des T CD4⁺ non infectés par effet *bystander* contribuerait également à leur forte virulence (Espert et al. 2006; Doitsh et al. 2010). Des virus à tropisme dual R5/X4 ont également été décrits. Ce phénotype rare serait plus fréquemment retrouvé parmi les virus de sous-type D, qui ont par ailleurs été associés à une évolution rapide de la maladie (Kaleebu et al. 2002; Huang et al. 2007).

Les principales populations cellulaires infectées par le VIH-1 sont les lymphocytes T CD4⁺, les cellules dendritiques, les monocytes et les macrophages. De nombreuses autres cibles cellulaires ont cependant été décrites, telles que les cellules dendritiques folliculaires (FDC) ou encore les cellules épithéliales.

- **Les lymphocytes T CD4⁺.** Les T CD4⁺ sont la cible cellulaire majeure du VIH-1. Qualifiés de lymphocytes T auxiliaires, les lymphocytes T CD4⁺ jouent un rôle central dans le système immunitaire en potentialisant la fonction d'autres populations du système immunitaire, telles que les lymphocytes T CD8⁺ et les lymphocytes B. Il existe différentes sous-populations de T CD4⁺, qui peuvent être classifiées en Th effecteurs et en Th régulateurs. Les Th comprennent les Th1, Th2, Th9, Th17, Th22 ainsi que les Th folliculaires, une sous-population de Th impliquée dans la différenciation des lymphocytes B en plasmocytes dans les organes lymphoïdes secondaires. Les T CD4⁺ naïfs se différencient en Th suite à la reconnaissance par leur récepteur T (TCR) d'antigènes présentés par le CMH-II à la surface des cellules présentatrices d'antigènes (CPA). Une fraction des Th activés se différencie en lymphocytes T mémoires, qui peuvent être subdivisés en T mémoires centrales, effectrices et transitoires. Bien que théoriquement susceptibles au VIH-1, les T CD4⁺ mémoires centrales et les T CD4⁺ naïfs sont rarement infectés de manière productive, du fait de l'expression de SAMHD1 (Descours et al. 2012).
- **Macrophages.** Les macrophages sont des cellules immunitaires différenciées et résidentes. Leurs fonctions principales sont la phagocytose de pathogènes et de débris cellulaires, ainsi que la présentation d'antigènes aux lymphocytes T CD8⁺ et CD4⁺ par le biais de leur molécules de CMH de classe I et II. Les macrophages expriment de faibles niveaux de CD4 et CCR5 et sont susceptibles à l'infection par le VIH-1 de tropisme R5 (Gartner et al. 1986). Du fait de la restriction imposée par SAMHD1, ces cellules sont cependant rarement infectées de manière productive (Hrecka et al. 2011; Laguette et al. 2011; Lahouassa et al. 2012). La susceptibilité des macrophages à l'infection par le VIH-1 dépend de leur localisation tissulaire (Kandathil et al. 2016). Les macrophages du système nerveux central,

appelés microglies, constituent le principal type cellulaire infecté retrouvé dans cet organe (Joseph et al. 2015a; Clayton et al. 2017).

- **Les monocytes.** Contrairement aux macrophages, les monocytes sont majoritairement circulants dans le sang périphérique. Lors d'une réaction inflammatoire, les monocytes sont rapidement recrutés aux sites de l'inflammation où ils peuvent se différencier en macrophages et en DC (Ginhoux et Jung 2014). Les monocytes sont susceptibles à l'infection par le VIH-1 de tropisme R5 (Gartner et al. 1986).
- **Les Cellules dendritiques (DC).** Les DC sont des cellules présentatrices d'antigène professionnelles qui jouent le rôle de sentinelle du système immunitaire. Suite à la capture d'antigènes, les DC mûrissent et activent les lymphocytes T CD8⁺ et CD4⁺ par la présentation respective d'antigènes sur leurs molécules de CMH de classe I et de classe II. Les DC sont parmi les premières cellules rencontrées par le virus lors de l'infection par voie sexuelle, et jouent un rôle crucial dans la dissémination du virus au niveau des muqueuses génitales et rectales lors de la primo-infection (Steinman 2000). Comme les macrophages, les DC sont susceptibles à l'infection par les virus de tropisme R5, mais leur infection est rarement productive, notamment du fait de l'expression de SAMHD1 dans leur cytoplasme (Hrecka et al. 2011; Laguette et al. 2011; Lahouassa et al. 2012). De plus, SAMHD1 impacte la présentation des antigènes viraux par les DC (Ayinde et al. 2015). Les particules virales qui lient le récepteur DC-SIGN à la surface des DC sont internalisées et dégradées dans un compartiment lysosomal (Moris et al. 2004), alimentant la source des antigènes viraux présentés aux T CD4⁺ et CD8⁺ (Moris et al. 2006; Coulon et al. 2016) Dans une minorité des cas, le virus échappe aux systèmes de dégradation des DC et infecte la cellule en *cis* ou est transmis aux T CD4⁺ en *trans*, selon un mécanisme d'endocytose médié par DC-SIGN et la formation de synapses virologiques entre les deux types cellulaires (Geijtenbeek et al. 2000; Arrighi et al. 2004; Blanchet et al. 2011; Bracq et al. 2018). La transmission du virus de cellule à cellule a été décrite pour être 100 à 1000 fois plus efficace que la transmission médiée par les particules virales libres (Patel et al. 2014).
- **Les cellules épithéliales.** La transmission du VIH-1 par voie sexuelle fait intervenir des interactions complexes entre les muqueuses des tractus génitaux et les particules virales. La capacité du virus à infecter les cellules épithéliales de ces muqueuses reste mal comprise. Toutefois, une étude *in vitro* a récemment suggéré que ce type cellulaire pouvait être infecté

de manière non productive par les virus X4 et R5 (Terrasse et al. 2017). Cette étude a également confirmé le transit des virus R5 dans le cytoplasme des cellules épithéliales, confirmant un précédent modèle *in vitro* (Bomsel 1997; Bobardt et al. 2007). Dans leur étude récente, Terrasse et al confortent ces résultats et suggèrent que le virus qui transite dans le cytoplasme des cellules épithéliales peut infecter des PBMC.

b. Les différents stades cliniques de l'infection par le VIH-1

L'infection naturelle par le VIH-1 suit une progression caractérisée par 3 phases principales (Figure 13):

- **La Primo-infection ou phase aigüe de l'infection**, qui peut être subdivisée en phase éclipse et en phases de Fiebig. **La phase éclipse** correspond au laps de temps écoulé entre l'infection du virus et la détection de la première infectée dans le sang. Durant cette phase, qui dure 1 à 2 semaines, le virus se propage dans les T CD4⁺ des muqueuses, et aucun marqueur viral n'est détectable (Stekler et al. 2018). **Les 6 phases de Fiebig** surviennent 2 à 6 semaines post-infection et ont été définies par l'apparition séquentielle dans le plasma : de l'ARN viral (phase i), de la p24 (phase ii), d'anticorps spécifiques du VIH-1 détectables par ELISA (phase iii) puis par western-blotting (phases iv à vi) (Fiebig et al. 2003). Au cours des phases de Fiebig, le taux de T CD4⁺ commence à décliner et des symptômes grippaux peuvent apparaître.
- **La phase chronique asymptomatique ou phase de latence clinique** fait suite à la primo-infection et dure en moyenne de 3 à 10 ans, bien que cette durée varie fortement en fonction des individus (Buchbinder et al. 1994). Le début de cette phase est caractérisé par une diminution marquée de la charge virale plasmatique et une restauration partielle du taux de T CD4⁺, conséquences de l'équilibre qui s'instaure entre le système immunitaire de l'hôte et la réplication virale. Au cours de la phase asymptomatique, le taux de T CD4⁺ décline progressivement et l'organisme peut commencer à présenter des symptômes d'immunodéficience.
- **La phase d'immunodéficience ou SIDA**, qui survient en moyenne 10 années post-infection, lors de la rupture de l'équilibre entre le système immunitaire et la réplication virale. Lors de cette phase, le système immunitaire s'effondre les individus infectés

deviennent susceptibles à des maladies opportunistes, dont les plus courantes sont la tuberculose et l'hépatite C (Carmichael 1997; Nouhin et al. 2009; Melkamu et al. 2013; Teweldemedhin et al. 2018). Ces infections opportunistes sont associées à la perte irréversible des T CD4⁺ et mènent ultimement à la mort de l'individu.

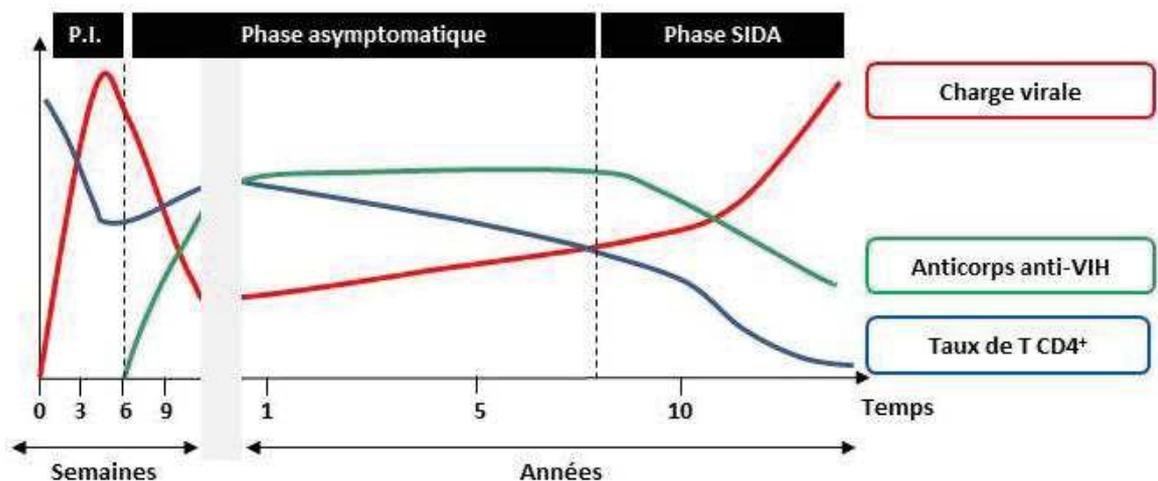


Figure 13 : Evolution de la charge virale plasmatique, du taux de T CD4⁺ et d'anticorps spécifiques du VIH-1 au cours des trois phases naturelles de l'infection par le VIH-1. P.I : Primo-infection.

c. Etablissement de réservoirs latents au cours de l'infection

La présence de **cellules infectées de manière latente**, qui forment un **réservoir viral** indétectable par le système immunitaire, constitue l'un des principaux freins à l'éradication du virus chez les individus infectés. Ce réservoir est établi dès les premières heures de l'infection par le VIH-1 (Chun et al. 1998), et persiste malgré l'efficacité des traitements antirétroviraux. Cette persistance se traduit par un rebond de la charge virale lors de l'interruption du traitement des patients.

Dans l'infection par le VIH-1, la notion de réservoir viral est débattue, mais renvoie généralement à des **cellules infectées de manière latente et circulantes** dans le sang périphérique (Chun et al. 1998), les sécrétions sexuelles (Gagneux-Brunon et al. 2016) et le lait maternel (Van de Perre et al. 2012). La notion de réservoir viral renvoie également à des **compartiments tissulaires** ou **sanctuaires anatomiques** dans lesquels les molécules antirétrovirales diffusent peu (Poles et al. 2006; Fletcher et al. 2014). Ces réservoirs tissulaires

comportent des cellules infectées de manière productive et des cellules infectées de manière latente, et comprennent principalement les tissus associés aux organes lymphoïdes secondaires et le système nerveux central. Les réservoirs tissulaires sont les plus gros contributeurs du réservoir viral d'un individu. Le tissu lymphoïde associé à l'intestin (GALT) est le principal réservoir tissulaire du VIH-1 (Vergnon-Miszczycha et al. 2015). En effet, le GALT comprend 80% des lymphocytes de l'organisme, dont une majorité de T CD4+ activés et mémoires, qui sont les principales cibles du VIH-1 (Cerf-Bensussan et Guy-Grand 1991; Brenchley et al. 2004). De ce fait, une intense réplication virale a lieu dès les premières heures de l'infection au sein du GALT, qui montre par la suite une importante lymphopénie.

Les cellules infectées de manière latente contiennent un **provirus transcriptionnellement inactif**, par opposition aux cellules infectées de manière productive dont le provirus s'exprime. Le réservoir a longtemps été défini comme des cellules possédant un provirus latent capable d'être réactivé. Cependant, plusieurs études parues ces dernières années ont mis en évidence l'existence de cellules infectées de manière latente et porteuses d'un provirus défectueux (Ho et al. 2013; Cohn et al. 2015; Bruner et al. 2016). Ces provirus défectueux présentent des hypermutations induites par les enzymes de la famille APOBEC3, de larges délétions internes, ou encore des mutations au niveau de la séquence d'encapsidation ou au niveau des sites donneurs d'épissage. Pour la plupart des provirus défectueux, la sévérité des mutations est telle que la réplication virale est avortée (Ho et al. 2013). Cependant, une partie des cellules porteuses d'un provirus défectueux conserveraient la capacité à produire des antigènes viraux reconnus par les lymphocytes T CD8+ de l'hôte (Pollack et al. 2017), et même des particules virales non infectieuses (Pasternak et Berkhout 2018). Chez un individu infecté par le VIH-1, ces cellules latentes porteuses d'un provirus défectueux constitueraient environ 93% du réservoir latent (Ho et al. 2013). Cette découverte a amené la communauté scientifique à segmenter les réservoirs d'un individu en **réservoirs latents fonctionnels et non fonctionnels**. La notion de réservoirs fonctionnel et non fonctionnel soulève plusieurs questions, notamment sur l'existence de marqueurs viraux ou cellulaires qui permettraient de cibler spécifiquement les réservoirs fonctionnels, ainsi que sur la fonction éventuellement exercée par ce type de réservoir.

La faible réplication virale résiduelle (souvent sous le seuil de détection de 50 copies d'ARN/mL) observée chez les individus sous traitement (Palmer et al. 2008), ainsi que le rebond viral observé suite à l'interruption du traitement serait donc principalement le fait d'une petite fraction de cellules infectées de manière latente et porteuses d'un provirus intact,

disséminées dans les organes lymphoïdes secondaires et principalement dans le GALT. Les cellules infectées de manière latente ont été décrites pour proliférer à bas bruit, un phénomène connu sous le nom d'**expansion clonale**. La contribution relative des cellules porteuses de provirus intacts et défectifs au phénomène d'expansion clonale reste inconnue (Chomont et al. 2009; Maldarelli et al. 2014; Wagner et al. 2014; Simonetti et al. 2016; Bui et al. 2017). La description de ce phénomène a ouvert de nouvelles perspectives et entraîne la reconsidération de la notion de réservoir viral.

Plusieurs mécanismes cellulaires et moléculaires sont impliqués dans la latence virale, mais tous n'ont pas été élucidés à ce jour. Les mécanismes impliqués incluent la **séquestration des facteurs de transcription** impliqués dans l'initiation de la transcription virale, l'accumulation de **marques épigénétiques répressives** au niveau du LTR 5' du VIH-1 (Van Lint et al. 2013) ainsi que des phénomènes d'**interférences transcriptionnelle au site d'insertion du génome proviral** (Cohn et al. 2015) (**voir partie III1b de l'introduction**). En effet, bien que le VIH-1 s'intègre préférentiellement dans les introns de gènes transcriptionnellement actifs (Han et al. 2004; Cohn et al. 2015), des phénomènes d'interférence transcriptionnelle interviendraient entre le gène cellulaire et le génome proviral (Lenasi et al. 2008). Par ailleurs, dans une minorité des cas, le VIH-1 s'intégrerait dans des régions de la chromatine transcriptionnellement inactives. La faible expression de la protéine Tat, qui est l'une des conséquences de la faible activation de la transcription virale sens, jouerait également un rôle important dans le maintien de la latence virale (Van Lint et al. 2013; Sengupta et Siliciano 2018).

La latence virale est donc intimement liée aux propriétés et au niveau d'activation des cellules infectées. En effet, parmi les principaux contributeurs des réservoirs viraux se trouvent les T CD4+ mémoires (Chun et al. 1995, 1998; Finzi et al. 1997; Wong et al. 1997), ainsi que les macrophages (Honeycutt et al. 2016). Les T CD4+ mémoires étant peu susceptibles à l'infection par le VIH-1, leur infection serait le fait de l'infection de T CD4+ activés qui se seraient ultérieurement différenciés en T mémoires. Parmi les T CD4+ mémoires, les T mémoires centrales et transitoires seraient les principaux contributeurs au phénomène d'expansion clonale (Chomont et al. 2009; Vandergeeten et al. 2013). Outre les T CD4+ mémoires et les macrophages, d'autres populations immunitaires ont été suggérées pour contribuer au réservoir latent, parmi lesquels les monocytes, les DC, les T CD4+ naïves (Ostrowski et al. 1999; Chomont et al. 2009), les cellules souches mémoires ou encore les Th17 (Lee et Lichterfeld 2016).

2. Impact de l'infection par le VIH-1 sur le système immunitaire de l'hôte

a. Déplétion massive des TCD4+ (lymphopénie)

Dès la primo-infection, l'intense réplication virale qui a lieu dans le GALT conduit à une déplétion massive des T CD4+ muqueux, ou **lymphopénie** (Guadalupe et al. 2003; Vergnon-Miszczycha et al. 2015). La lymphopénie résulte de l'effet cytopathique direct du virus sur les T CD4+ (Perelson et al. 1997; Brenchley et al. 2006), mais également de la mort cellulaire des T CD4+ non infectés, par apoptose ou pyroptose (Espert et al. 2006; Doitsh et al. 2010; Borel et al. 2012). La mort des T CD4+ par apoptose est induite par des protéines virales libres dans le plasma comme Tat et Vpr (Levy et al. 1994; Vendeville et al. 2004), associées à des exosomes comme Nef (Lenassi et al. 2010) ou présente à la surface des cellules infectées comme Env (Espert et al. 2006; Borel et al. 2012).

b. Activation chronique du système immunitaire

L'infection par le VIH-1 engendre un état d'**hyperactivation immunitaire chronique**, dont les causes sont multifactorielles (Younas et al. 2016). Le **VIH-1 *per se*** contribue à l'activation du système immunitaire. En effet, la réplication virale qui persiste à bas bruit même chez les individus sous traitement induit la reconnaissance d'antigènes viraux par les cellules du système immunitaire et la production d'interféron de type I par les DC plasmacytoïdes (Beignon et al. 2005). La **lymphopénie** qui survient dès la primo-infection entraîne la perte des fonctions auxiliaires des T CD4+ impliqués dans plusieurs processus immunitaires, tels que la différenciation des lymphocytes B en plasmocytes ou le développement de la réponse T CD8+ cytotoxique. La lymphopénie sévère qui affecte le GALT, et notamment la déplétion des Th17 anti-inflammatoires, induit également un phénomène de **translocation microbienne**, qui contribue à l'activation chronique des cellules du système immunitaire (Brenchley et al. 2006; Vergnon-Miszczycha et al. 2015). La perte des fonctions auxiliaires associé à la lymphopénie favorise également l'apparition de co-infections, telles que les infections par les virus des hépatite B et C (Kovacs et al. 2008; Bautista-Amorocho et al. 2014). Ces co-infections contribuent également à la persistance d'un état inflammatoire chronique. Enfin, l'épuisement des cellules du système immunitaire et leur sénescence promeuvent également leur activation, et contribuent donc à l'état d'activation chronique (Younas et al. 2016).

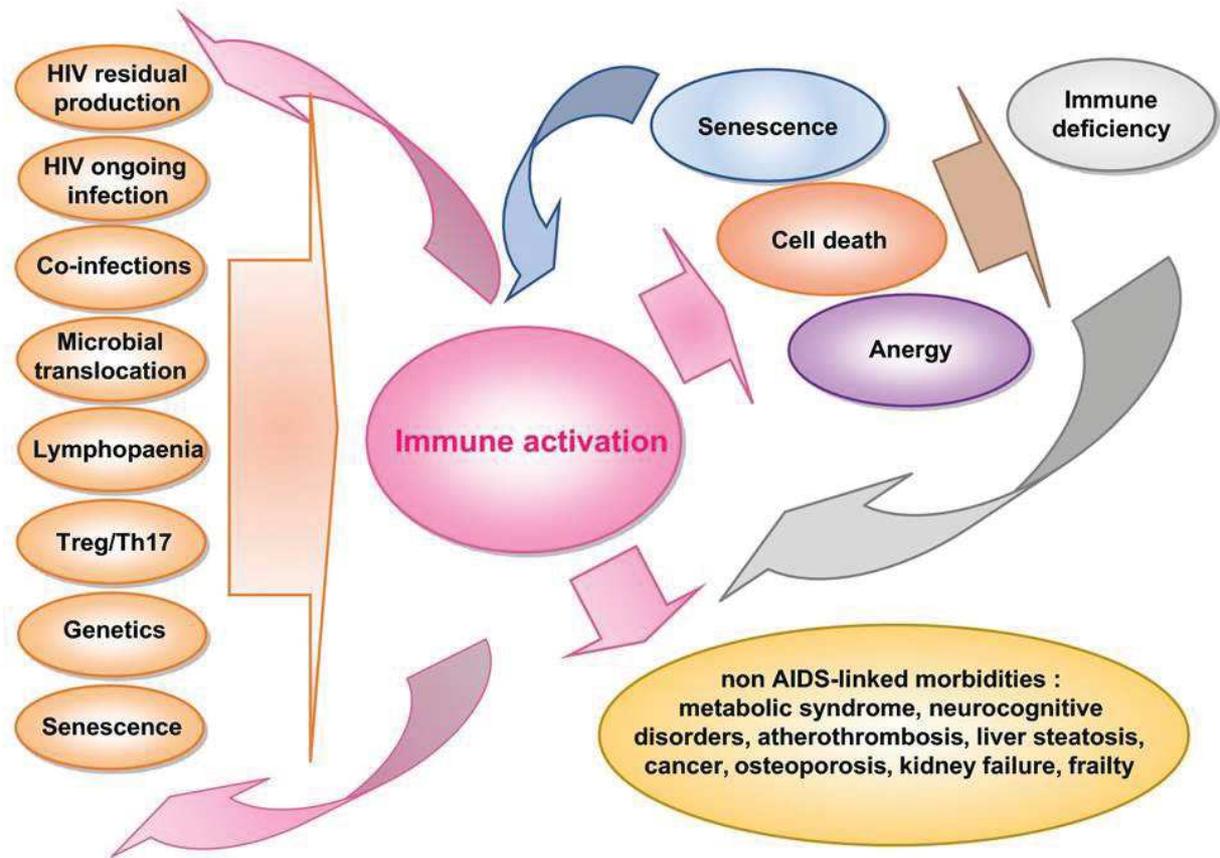


Figure 14 : Principaux processus impliqués dans l'activation immunitaire chronique observée chez les individus infectés par le VIH-1 (Younas et al. 2016).

c. Dérégulation du système immunitaire

L'infection par le VIH-1 est également marquée par le **dysfonctionnement** des différentes populations immunitaires et par le développement d'une **réponse immuno-modulatrice** qui contribue au maintien de la persistance virale (Vandergeeten et al. 2012). La réponse immuno-modulatrice observée chez les patients découle de la réponse inflammatoire chronique générée par l'hyperactivation du système immunitaire, et inclue (i) une augmentation de la proportion de T CD4⁺ régulateurs, (Ji et Cloyd 2009; Nigam et al. 2010), (ii) la production de cytokines anti-inflammatoires telles que l'IL-10 et le TGF- β , (iii) l'augmentation de l'expression de régulateurs négatifs de l'activation des lymphocytes T tels que PD-1 et CTLA-4 (Day et al. 2006; Said et al. 2010), et la production d'indoleamine 2,3-dioxygénase-1 (IDO) dans les DC et les monocytes (Favre et al. 2010).

La lymphopénie qui affecte les T CD4⁺ ainsi que l'épuisement des lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺, notamment caractérisé par une diminution de leur capacité proliférative et de leur activation *de novo* (Betts 2006; Day et al. 2006), contribue également au dysfonctionnement des différentes populations du système immunitaire. Chez les individus infectés, les lymphocytes B, les cellules NK, les DC, les monocytes et les macrophages présentent un niveau élevé de marqueurs d'activation et de sénescence, et leurs fonctions effectrices sont altérées (Younas et al. 2016). La capacité des lymphocytes B et des DC à activer les cellules T est diminuée, la capacité cytotoxique des cellules NK est affectée, et les capacités phagocytaires et microbicides des macrophages sont altérées (Klatt et al. 2013). L'ART ne permet pas de restaurer l'homéostasie du système immunitaire.

d. Marqueurs de la progression de la pathologie

L'existence de biomarqueurs susceptibles (i) d'évaluer le stade de la pathologie des individus nouvellement diagnostiqués et (ii) de prédire l'évolution de la pathologie fait l'objet d'intenses recherches. En effet, l'analyse de ces biomarqueurs chez les patients permettrait un suivi plus fin de l'évolution de la pathologie et de leur réponse au traitement. Les premières recherches cliniques se sont principalement focalisées sur l'analyse du **taux de T CD4⁺** et de la **charge virale (CV)** plasmatiques comme biomarqueurs.

La **mesure du taux de T CD4⁺ plasmatique** donne une bonne indication de la progression de la pathologie (Goujard et al. 2006; Phillips et Lundgren 2006). Dans les 6 premiers mois suivant l'initiation de l'ART, le taux de T CD4⁺ est un fort indicateur de la progression immunitaire et d'éventuels échecs virologiques (Duncombe et al. 2005; van Leth et al. 2005). Depuis 2015, l'OMS recommande l'initiation de l'ART de tous les adultes infectés par les VIH-1 et -2, quel que soit leur taux de T CD4⁺ (WHO Guideline 2015). Cependant, si l'ART permet chez la plupart des patients une restauration partielle du taux de T CD4⁺, leur fonction reste altérée par l'hyper-activation globale du système immunitaire qui persiste sous traitement (Klatt et al. 2013; Younas et al. 2016). Par ailleurs, le taux de T CD4⁺ mesuré dans le sang périphérique ne constitue qu'une fraction mineure du pool total de T CD4⁺, dont la majeure partie est localisée dans les organes lymphoïdes secondaires et plus précisément dans le GALT.

La **mesure de la CV plasmatique** repose sur la détection d'ARN viral plasmatique, classiquement par des techniques de RT-PCR. Chez environ 80% des individus non traités, la

CV est directement corrélée à la progression de la maladie et inversement corrélée au taux de T CD4⁺ (Arnaout et al. 1999; Thiébaud et al. 2005). En l'absence de traitement, la CV atteint un équilibre environ un an après l'infection (Ho 1996). La valeur de la CV à ce point d'équilibre est donc un bon indicateur du contrôle de la réplication virale chez le patient (Hubert et al. 2000; Langford et al. 2007). L'association entre la CV et la progression de la maladie chez les patients sous ART est plus controversée. En outre, la CV plasmatique ne prend pas en considération l'ARN viral associé aux cellules dans les tissus lymphoïdes et les muqueuses (Klatt et al. 2013). Par ailleurs, la plupart des tests disponibles dans le commerce ont été conçus pour détecter l'ARN viral issu de virus de sous-type B, alors que les pays à ressource limitée sont caractérisés par la circulation d'une grande diversité de sous-types, CRF et URF du VIH-1 (Fiscus et al. 2006; Hemelaar et al. 2019). Dernièrement, plusieurs kits commerciaux permettant la détection de différentes souches virales du VIH-1, mais également du groupe O du VIH-1 et du VIH-2 ont été développés (Rouet et al. 2008; Etienne et al. 2013a; Avettand-Fenoel et al. 2014; Ruelle et al. 2014; Guichet et al. 2016).

Bien qu'informatifs sur le stade de l'infection et la réponse au traitement des individus, la mesure de la CV et du taux de T CD4⁺ plasmatiques ne permettent cependant d'évaluer ni la taille du réservoir viral, ni le niveau d'activation globale du système immunitaire. Plusieurs **biomarqueurs de réservoirs viraux** ont été proposés ces dernières années, parmi lesquels la molécule CD30 (Hogan et al. 2018), la molécule CD2 (Iglesias-Ussel et al. 2013), le récepteur CD32a (Descours et al. 2017), et des récepteurs de chémokines (Bruel et Schwartz 2018). Parmi ces différents biomarqueurs potentiels, le récepteur CD32a est celui qui a reçu le plus d'attention. En utilisant comme modèle des T CD4⁺ primaires infectées *ex vivo* de manière latente, Descours et al ont rapporté l'augmentation de l'expression de CD32a dans les T CD4⁺ latents aux niveaux transcriptionnel et protéique. Ces résultats ont été reproduits par une équipe (Hogan et al. 2018), et controversés par d'autres (Abdel-Mohsen et al. 2018; Martin et al. 2018; Wittner et al. 2018). En particulier, deux études ont rapporté une proportion identique de T CD4⁺ exprimant CD32a parmi les cellules infectées de manière latentes ou productives (Martin et al. 2018; Wittner et al. 2018). Si ces différentes études s'accordent sur l'expression de CD32a par une fraction des cellules latentes, la nature du réservoir qui exprime ces cellules reste incomprise.

D'autres marqueurs de l'évolution de la pathologie ont également été proposés, tels que le ratio des taux de T CD8⁺/T CD4⁺ (Serrano-Villar et al. 2014; Mussini et al. 2015), des

marqueurs d'activation comme les cytokines pro-inflammatoires (Kuller et al. 2008), ou encore des marqueurs de la translocation microbienne tels que le CD14 soluble (Marchetti et al. 2011). Certains facteurs liés à l'hôte sont également prédictifs d'un bon contrôle de la réplication virale (Fellay et al. 2009). Je reviendrai sur ces facteurs **dans la partie 03c de l'introduction**.

3. Réponse immunitaire adaptative de l'hôte induite par le VIH-1

L'infection par le VIH-1 induit chez l'hôte une réponse immunitaire adaptative capable de contrôler partiellement la réplication virale. Cliniquement, ce contrôle partiel se traduit par une phase asymptomatique qui dure de 3 à 10 ans en l'absence de traitement.

a. Réponse humorale dirigée contre le VIH-1

Mon projet de thèse portant sur les anticorps dirigés contre la Protéine Antisens du VIH-1, je détaillerai la genèse et la structure des anticorps avant de m'intéresser aux anticorps générés dans le contexte de l'infection par le VIH-1.

Structure et genèse des anticorps

Suite à une infection virale, une réponse anticorps systémique, encore appelée **réponse humorale**, est mise en place. Les anticorps ou Immunoglobulines (Ig) sont produits par les lymphocytes B, dont ils constituent une partie du récepteur (BCR). Au cours de leur développement, les lymphocytes B porteurs d'Ig membranaires quittent la moelle osseuse pour les organes lymphoïdes secondaires qui incluent les ganglions lymphatiques, la rate et les tissus lymphoïdes associés aux muqueuses (MALT). Au sein des organes lymphoïdes secondaires, les lymphocytes B rencontrent leur antigène et se différencient en **plasmocytes** sécréteurs d'anticorps et en lymphocytes B mémoires. Les plasmocytes sécréteurs d'anticorps gagnent le reste de l'organisme via les circulations sanguine et lymphatique.

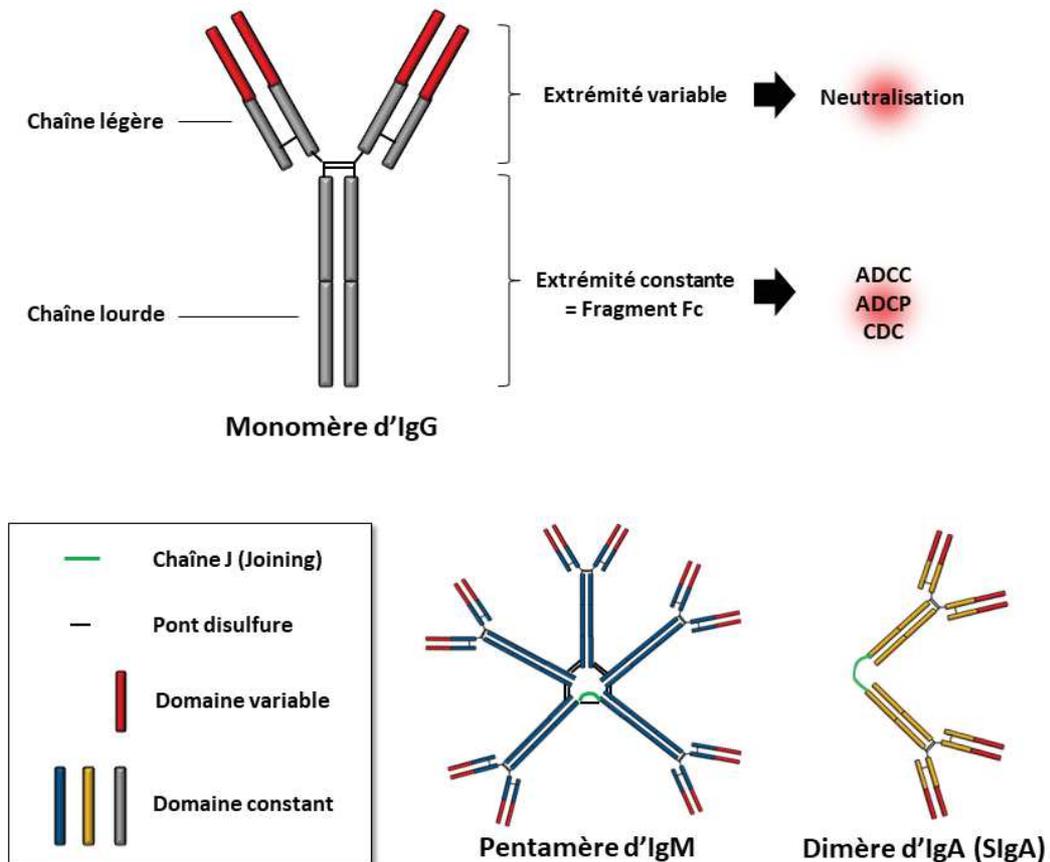


Figure 15: Structure des principaux isotypes d'immunoglobulines et fonctions associées.

Les anticorps appartiennent à la super-famille des immunoglobulines et sont des protéines hétérodimériques constituées de 4 chaînes polypeptidiques : 2 chaînes lourdes et 2 chaînes légères. Chaque chaîne est composée d'un domaine variable en N-terminal et d'un ou plusieurs domaines constants en C-terminal. Les chaînes légères ne sont constituées que d'un seul domaine constant, tandis que les chaînes lourdes se composent de trois ou quatre domaines constants, dont les deux premiers sont séparés par une région charnière. Les chaînes lourdes et légères sont liées entre elles par des ponts disulfures. Le repliement des 4 chaînes polypeptidiques de l'anticorps définit trois extrémités fonctionnelles :

- **Deux extrémités variables** qui confèrent la spécificité de la reconnaissance à l'antigène. Ces extrémités sont uniques à chaque clone de lymphocyte B.
- **Une extrémité constante**, également nommée **Fragment cristallisable (Fc)**, qui détermine l'**isotype** de l'anticorps. Cette extrémité confère aux anticorps la capacité de se lier (i) à des récepteurs aux fragments Fc (**FcR**) situés à la surface de cellules effectrices immunitaires et

endothéliales et (ii) à la protéine C1q du complément. Il existe 5 principaux isotypes d'Ig qui diffèrent par leur structure et leur affinité aux FcR (Figure 15):

- **L'isotype M (IgM)**, qui est le premier isotype exprimé par les lymphocytes B au cours du développement. Présents sous forme de monomères à la surface des lymphocytes B (BCR), ils sont sécrétés sous forme pentamérique. Les IgM activent très efficacement le système du complément, mais possèdent une faible affinité à l'antigène.
- **L'isotype D (IgD)**. Les IgD sont exprimées à la surface des cellules B lors de leur sortie de la moelle osseuse et de leur colonisation des organes lymphoïdes secondaires. La plupart des cellules B co-expriment les IgD avec des IgM. Les IgD sont également retrouvées à de faibles concentrations plasmatiques chez les personnes infectées, mais la fonction des IgD circulante reste méconnue.
- **L'isotype E (IgE)**. Les IgE sont présents à une faible concentration plasmatique et sont impliqués dans les réactions allergiques. Les IgE lient avec une très forte affinité le récepteur du fragment Fc des IgE (FcεRI) présents à la surface des mastocytes, des basophiles, des cellules de Langerhans et des éosinophiles.
- **L'isotype A (IgA)**. Présentes à de faibles concentrations dans le plasma, les IgA constituent l'isotype majoritaire dans les **muqueuses** et les fluides associés. Par contraste avec la salive, le lait maternel ou encore le tractus gastro-intestinal, les IgA ne constituent pas l'isotype prédominant du tractus génital, où le ratio IgG/IgA est de 10 :1 (Gagneux-Brunon et al. 2017). Il existe deux isotypes d'IgA, les IgA1 et les IgA2. Présentes sous forme monomérique dans le plasma, les IgA sont retrouvées sous forme de dimères au niveau des muqueuses, où elles sont associées à deux chaînes polypeptidiques : la chaîne J (Joining) et le composé sécrétoire, une glycoprotéine qui protège les IgA de la protéolyse. La chaîne J, également associée aux pentamères d'IgM, est produite par les cellules B et nécessaire à la sécrétion des IgA (Schroeder et Cavacini 2010). Les IgA constituent la première ligne de défense des surfaces muqueuses contre les toxines, les virus et les bactéries.
- **L'isotype G (IgG)**. L'isotype G est l'isotype prédominant dans l'ensemble de l'organisme, et notamment au niveau plasmatique. Il existe 4 isotypes d'IgG, numérotés de 1 à 4 (IgG1, IgG2, IgG3 et IgG4). Les isotypes d'IgG diffèrent par la structure de leur fragment Fc, ce qui se traduit par des affinités différentes pour les FcR spécifiques des IgG, et donc par des différences fonctionnelles.

Les chaînes lourdes et légères des anticorps sont codées par des familles multigéniques distinctes localisées sur des chromosomes différents. Pour les deux types de chaînes, le domaine variable est codé par les segments géniques V (Variable), D (Diversity) et J (Joining) et le domaine constant par des exons individuels (C). Les segments géniques V, D, J et les exons C codant pour les chaînes lourdes sont localisés sur le chromosome 14, tandis que deux locus situés sur deux chromosomes différents portent les segments géniques V/ J et les exons C codant pour les chaînes légères:

- Le **locus kappa** situé sur le chromosome 2
- Le **locus lambda** situé sur le chromosome 22

L'expression des locus kappa et lambda est mutuellement exclusive, si bien qu'une cellule B exprime l'une ou l'autre de ces chaînes légères. Le ratio des immunoglobulines plasmatiques possédant les chaînes légères kappa : lambda est de 2 :1 chez les individus sains, mais ce ratio est inversé (1 :2) parmi les immunoglobulines du lait maternel (Molé et al. 1992). Par ailleurs, un biais en faveur des chaînes légères lambda a été rapporté parmi les IgG plasmatiques dirigées contre la protéine Env du VIH-1 (Sajadi et al. 2016).

Un nombre important de **réarrangements** et de **mutations génétiques** affectent les gènes codant pour les Ig au cours du développement d'un lymphocyte B. Ces divers réarrangements sont à l'origine de la grande diversité du répertoire d'anticorps d'un individu (Schroeder et Cavacini 2010) et augmentent l'affinité des Ig pour leur antigène. La première série de réarrangements a lieu dans la moelle osseuse et affecte les segments géniques V, D et J. Suite à cette étape, les cellules B expriment des Ig membranaires (IgM et IgD) et migrent dans les **centres germinatifs** des organes lymphoïdes secondaires. Au sein des centres germinatifs, les lymphocytes B matures rencontrent leur antigène spécifique, ce qui induit une seconde série de réarrangements des segments géniques V(D)J. Ces réarrangements modulent l'affinité des Ig pour leur antigène : il s'agit des **hypermutations somatiques** (Mesin et al. 2016) (Figure 16). Enfin, le lymphocyte B subit un phénomène de **commutation de classe**, qui consiste en la recombinaison des gènes codant pour les régions constantes (Figure 16). Cette étape fait intervenir des interactions complexes entre les T CD4+ folliculaires et les lymphocytes B et induit l'expression de nouveaux isotopes d'Ig à la surface des lymphocytes B : les IgA, IgG et IgE. Les lymphocytes B matures porteurs d'Ig de haute affinité pour leur antigène subissent une expansion clonale et une différenciation en plasmocytes sécrétrices d'anticorps ou en

lymphocytes B mémoires (Figure 16). Les plasmocytes sont par la suite distribués à l'ensemble de l'organisme via la circulation sanguine et lymphatique.

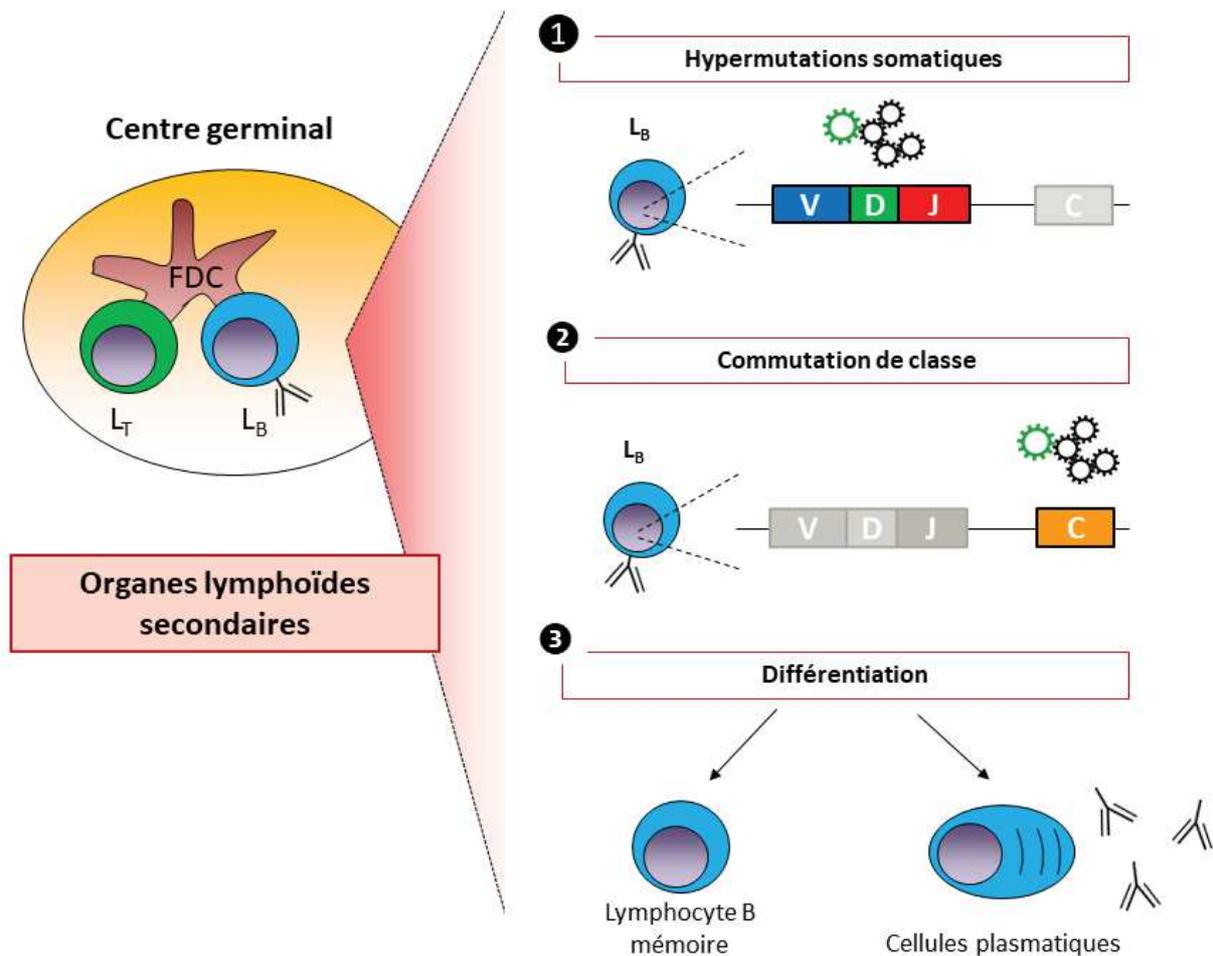


Figure 16: Principales étapes du développement d'un lymphocyte B dans les organes lymphoïdes secondaires.

Fonctions effectrices des anticorps lors d'une infection virale

Les anticorps exercent une large palette d'activités antivirales. Par le biais de leurs extrémités variables, les anticorps ont une **activité neutralisante** sur le virus en empêchant sa liaison aux récepteurs des cellules cibles (Figure 15). Par le biais de leur fragment Fc, les anticorps lient les FcR présents à la surface des cellules immunitaires et endothéliales et la protéine du complément C1q (Figure 15). La liaison du fragment Fc aux FcR induit des fonctions effectrices qui dépendent de la nature du récepteur et de la cellule qui l'exprime. En

effet, différents FcR lient spécifiquement le fragment Fc d'un isotype d'anticorps donné : les FcαR, FcεR et FcγR lient respectivement les IgA, les IgE et les IgG.

- La liaison des IgE aux FcεR induit la dégranulation et le relargage de médiateurs inflammatoires par les mastocytes, les éosinophiles et les basophiles (MacGlashan 2012).
- La liaison des IgG et dans une moindre mesure des (S)IgA à leurs récepteurs induit les fonctions effectrices suivantes (Ravetch et Bolland 2001; Mkaddem et al. 2014) :
 - **La phagocytose dépendante des anticorps (ADCP).** L'ADCP a lieu lorsque les FcR à la surface des monocytes, des DC et des macrophages lient les anticorps complexés à la surface d'une particule virale. Ce processus, qui requiert l'**opsonisation** préalable de la particule virale, induit la phagocytose et la dégradation du virus.
 - **La cytotoxicité à médiation cellulaire dépendant des anticorps (ADCC).** L'ADCC désigne le procédé par lequel des anticorps recrutent des cellules effectrices pour induire la mort ciblée d'une cellule infectée par des mécanismes indépendants de la phagocytose. Ce processus requiert (i) la liaison des anticorps à l'antigène situé à la surface des cellules cibles infectées et (ii) la liaison des anticorps aux FcR présents à la surface de cellules immunitaires effectrices telles que les NK, les monocytes, les macrophages, les neutrophiles, les éosinophiles et les DC. Une fois activées, les cellules effectrices induisent la mort de la cellule cible via le relargage de granules cytotoxiques, la signalisation via le récepteur Fas et l'élaboration d'espèces réactives à l'oxygène.
 - **La cytotoxicité dépendante du complément (CDC).** Ce processus requiert d'une part (i) la liaison des anticorps à l'antigène viral à la surface des cellules cibles infectées ou l'opsonisation de la particule virale par des anticorps, et d'autre part (ii) la liaison du fragment Fc des anticorps à la protéine C1q du complément. Cette liaison induit l'activation de la voie classique du complément et la lyse de la cellule infectée ou de la particule virale. Les IgM possèdent une plus forte capacité à induire la CDC.

Réponse humorale dans l'infection par le VIH-1

La difficulté à générer des anticorps contre le VIH-1 est due (i) à la forte variabilité génétique du virus qui engendre une diversité quasi infinie d'antigènes viraux et (ii) à la forte glycosylation des glycoprotéines d'enveloppe qui masquent les potentiels sites de reconnaissance à l'antigène (Walker et Burton 2008). Par ailleurs, la lymphopénie qui caractérise l'infection par le VIH-1 résulte en une perte des fonctions auxiliaires endossées par

les T CD4+, ce qui altère le fonctionnement des centres germinaux et la production des anticorps par les lymphocytes B (Biberfeld et al. 1986; Pantaleo et al. 1993).

Les premiers anticorps dirigés contre le VIH-1 apparaissent 2 à 4 semaines après le début de l'infection et échouent généralement à contrôler la réplication virale (Tomaras et al. 2008; Haynes et al. 2011). Après plusieurs mois d'infection, des **anticorps neutralisants** apparaissent. Cependant, du fait de l'important taux de mutations du VIH-1, les anticorps neutralisants sont rarement efficaces contre les virus contemporains. Chez une poignée d'individus, ces anticorps développent la capacité de neutraliser une grande variété d'isolats viraux, et sont alors qualifiés d'anticorps **largement neutralisants** ou *broadly neutralizing antibodies* (Moog et al. 1997; Gray et al. 2011). La génération d'anticorps largement neutralisants reste l'un des objectifs majeurs de la recherche vaccinale (Walker et Burton 2008). Outre la neutralisation des particules virales, la liaison des anticorps à la surface du VIH-1 favorise la lyse des particules virales par la voie du complément. Dans l'infection par le VIH-1, l'opsonisation des particules virales prévient l'intégration du provirus dans les DC et le transfert du virus des DC aux T CD4+ (Holl et al. 2006; Wilflingseder et al. 2007). Cependant, l'opsonisation des particules virales diminuerait la capacité des DC à activer les T CD8+ (Bánki et al. 2010; Posch et al. 2012).

La réponse anticorps dirigée contre le VIH-1 est dominée par les réponses anti-Env et anti-Gag. Les premiers anticorps générés au cours de l'infection sont dirigés contre la gp41, et plus particulièrement contre la région MPER impliquée dans la fusion membranaire. Les anticorps dirigés contre la gp120 et Gag (p24, p55) apparaissent 5 à 15 jours plus tard (Tomaras et Haynes 2009) (Figure 17). Les isotypes IgG1 et IgG3 sont les majeurs contributeurs de la réponse anticorps anti-VIH-1. Ces deux isotypes sont capables d'induire l'ADCC chez les patients infectés, mais la capacité des IgG3 anti-Env à neutraliser le virus et à induire l'ADCP est supérieure à celle des IgG1 (Scharf et al. 2001; Tay et al. 2016). La présence d'IgG2 anti-gp41 et anti-p24 au cours de l'infection a été corrélée au contrôle spontané de la virémie ou post-vaccinal chez les patients (Ngo-Giang-Huong et al. 2001; Martinez et al. 2005; French et al. 2017). Outre les IgG, les IgA exercent également un rôle important dans l'infection par le VIH-1. Les IgA plasmatiques et muqueuses exercent des fonctions différentes dans l'infection par le VIH-1. Le taux d'IgA plasmatiques a été positivement corrélé avec le développement d'infections à risque dans l'essai clinique RV144 (Kim et al. 2015), tandis que les IgA des muqueuses confèrent une protection contre le virus. Un important taux d'IgA dans le lait maternel est associé à une diminution du risque de transmission de la mère à l'enfant (Pollara

et al. 2015), et la présence d'IgA neutralisantes dans les sécrétions génitales est associée à des taux d'infection plus faibles parmi les femmes séro-exposées (Lund et al. 2017). La perte des fonctions auxiliaires associée à la lymphopénie affecte l'intégrité des centres germinaux et résulte en une diminution du taux de IgA dans les fluides associés aux muqueuses (Kulkarni et Ruprecht 2017). Cela affecte l'immunité des muqueuses et favorise la translocation microbienne, contribuant ainsi à l'état d'hyperactivation immunitaire.

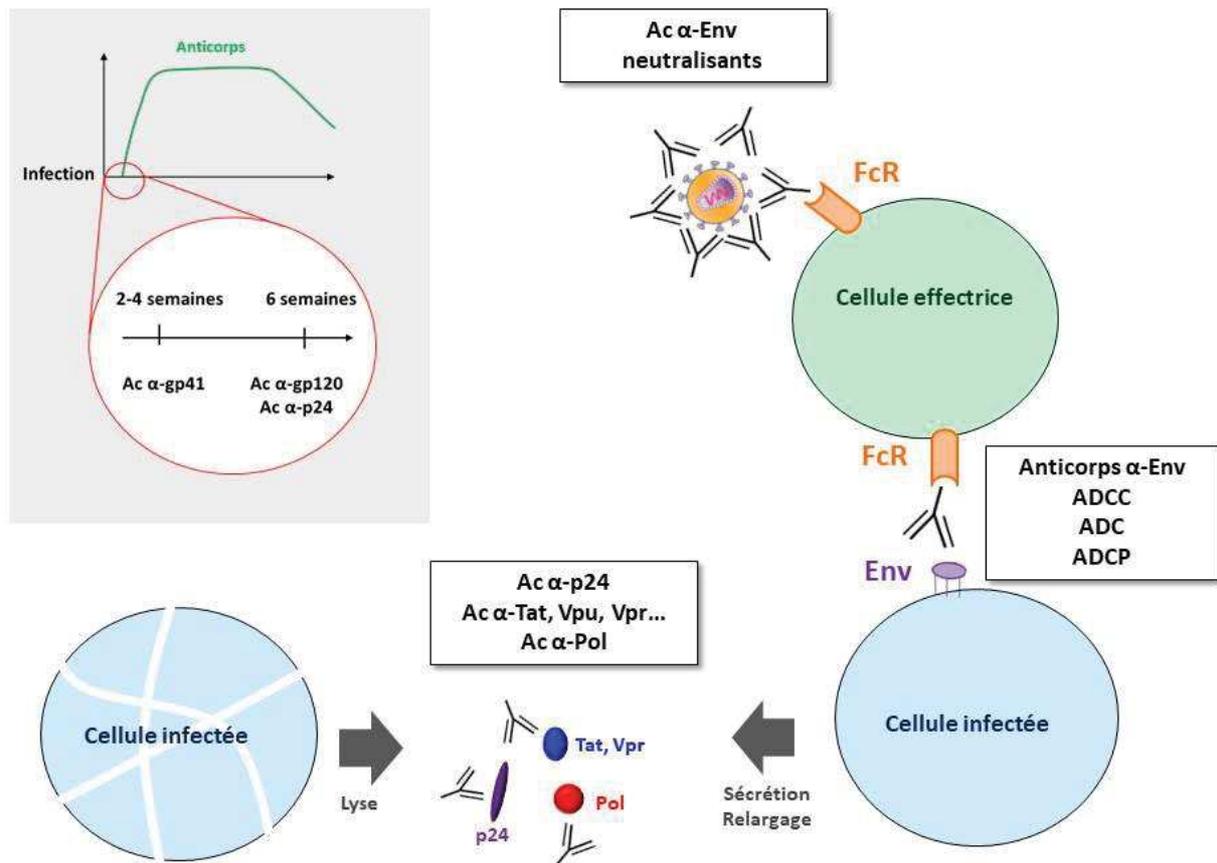


Figure 17 : Les protéines Gag, Env, Pol et les protéines auxiliaires du VIH-1 élicitent une réponse anticorps chez le patient.

Le taux d'anticorps dirigés contre le VIH-1 augmente jusqu'à 40 semaines suivant le début de l'infection (Killian et al. 2006). Il y a peu de changement du taux d'anticorps dirigés contre les protéines du VIH-1 au cours de l'infection chronique, même chez les patients qui développent le SIDA (French et al. 2017). La persistance de la réponse anticorps a été associée à l'existence de cellules plasmatiques sécrétrices à longue durée de vie ainsi qu'à la réplication virale à bas bruit qui persiste même en présence de traitement et qui résulterait de la présentation

antigénique continue dans les centres germinaux (Palmer et al. 2008; French et al. 2017). L'initiation de l'ART résulte en une diminution du taux global d'IgG plasmatiques dirigés contre les protéines du VIH-1 (Killian et al. 2006; Zhang et al. 2017). En particulier, la diminution des taux plasmatiques d'IgG anti-p24 (Voltersvik et al. 2003) et anti gp40 (Delagreverie et al. 2019) reflètent la diminution de la réplication virale sous ART. Ces études suggèrent que la diminution du taux d'anticorps observée suite à l'initiation de l'ART est due à une diminution de la stimulation antigénique plutôt qu'à une diminution de l'activation du système immunitaire, et que la production d'anticorps spécifiques du VIH-1 est dépendante de la réplication virale et décline durant l'ART. Bien que l'introduction de l'ART tôt au cours de l'infection restaure partiellement l'architecture des centres germinaux, les lymphocytes B circulants restent dysfonctionnels. Il a été suggéré que l'initiation de l'ART à des stades très précoces pouvait prévenir l'apparition d'anticorps spécifiques du VIH, ce qui questionne sur la fenêtre temporelle optimale pour initier l'ART (Goulder et Deeks 2018).

Si les glycoprotéines d'enveloppe et les protéines structurales sont les cibles majeures des anticorps anti-VIH-1, les **protéines auxiliaires et régulatrices** du VIH-1 sont également ciblées par la réponse anticorps de l'hôte (Allan et al. 1985; Arya et Gallo 1986; Kan et al. 1986; Wong-Staal et al. 1987; Chanda et al. 1988; Strebel et al. 1988) (Figure 17). La prévalence des anticorps ciblant ces protéines chez les patients varie d'une étude à l'autre et s'échelonne de 20% à 60% (Reiss et al. 1989a ; Reiss et al. 1989b; O'Neil et al. 1997; Rezza et al. 2005; Nicoli et al. 2016). Les variations observées dans la prévalence de ces réponses anticorps a été attribuée aux techniques utilisées, mais également à la nature de l'antigène et aux caractéristiques virologiques et ethniques des cohortes dans lesquelles la réponse humorale a été étudiée (Nicoli et al. 2016). A l'exception de Tat, aucune association claire entre la présence d'anticorps ciblant les protéines auxiliaires/régulatrices et la progression de la maladie n'a été mise en évidence. La réponse anticorps anti-Tat a été associée au maintien de faibles taux de T CD4+ (Rezza et al. 2005) et à une plus faible progression vers la maladie (Zagury et al. 1998; Richardson et al. 2003; Rezza et al. 2005; Kulkarni et al. 2017). La présence d'anticorps capables d'immuno-précipiter ASP a également été mise en évidence dans le sera de patients infectés (Vanhée-Brossollet et al. 1995). **Je détaillerai cette étude dans la partie III2c de l'introduction.**

Anticorps anti-VIH-1 dans le lait maternel et Transmission au nouveau-né

Les IgG maternelles sont transférées au fœtus à travers le placenta lors de la gestation, ce qui confère au fœtus une protection contre les infections néonatales durant les premiers mois de sa vie (Malek et al. 1994). Outre le transfert d'anticorps maternels trans-placentaire, les nouveaux-nés sont également immunisés par les anticorps présents dans le **lait maternel** (Figure 18). Le lait maternel possède une plus faible concentration en leucocytes que le plasma. Les neutrophiles, les cellules myéloïdes et les lymphocytes représentent respectivement 80%, 15% et 5% des leucocytes du lait maternel (Figure 18). Les T CD4⁺ du lait maternel expriment le marqueur CD45 RO caractéristique des T mémoire, et exhibent davantage de marqueurs d'activation que les T CD4⁺ plasmatiques (Van de Perre et al. 2012).

Le lait maternel comprend également de nombreux facteurs solubles anti-microbiens et anti-inflammatoires tels que les IgA sécrétoires (Van de Perre et al. 2012). Les IgA sécrétoires constituent les isotypes largement majoritaires du lait maternel (Van de Perre et al. 1988; Van de Perre 2003; Wheeler et al. 2007). Les concentrations en IgM et en IgG dans lait maternel sont respectivement inférieures de 1 et 2 logs à celle des IgA (Wheeler et al. 2007). Contrairement aux IgG qui sont transférées du plasma au lait maternel, les IgA sont synthétisées localement par des cellules plasmatiques situées dans les glandes mammaires (Hanson et al. 1984; Wheeler et al. 2007; Van de Perre et al. 2012) (Figure 18). Des IgA, IgM et IgG de l'Enveloppe et des protéines Gag et Pol du VIH-1 ont été retrouvés dans le lait maternel de femmes infectées par le VIH-1 (Van de Perre et al. 1988, 1993; Bélec et al. 1990). Bien que les IgA prévalent dans le lait maternel, les IgG sont les principaux contributeurs (i) de la réponse anticorps anti-Env (Van de Perre et al. 1988, 1993; Bélec et al. 1990), et (ii) des activités neutralisantes et d'ADCC anti-VIH-1 détectées dans le lait maternel (Kuhn et al. 2006; Fouda et al. 2011; Mabuka et al. 2012). Cependant, plusieurs études ont rapporté l'absence de corrélation entre le taux d'anticorps anti-Env dans le lait maternel et la réduction du risque de transmission du VIH-1 via le lait maternel (Duprat et al. 1994; Becquart et al. 2000; Kuhn et al. 2006; Mabuka et al. 2012). Plus récemment, une étude réalisée sur une cohorte de femmes naïve de tout traitement a décrit une activité de neutralisation des IgG anti-Env plus importante dans le lait maternel des femmes qui ne transmettent pas le virus (Permar et al. 2015).

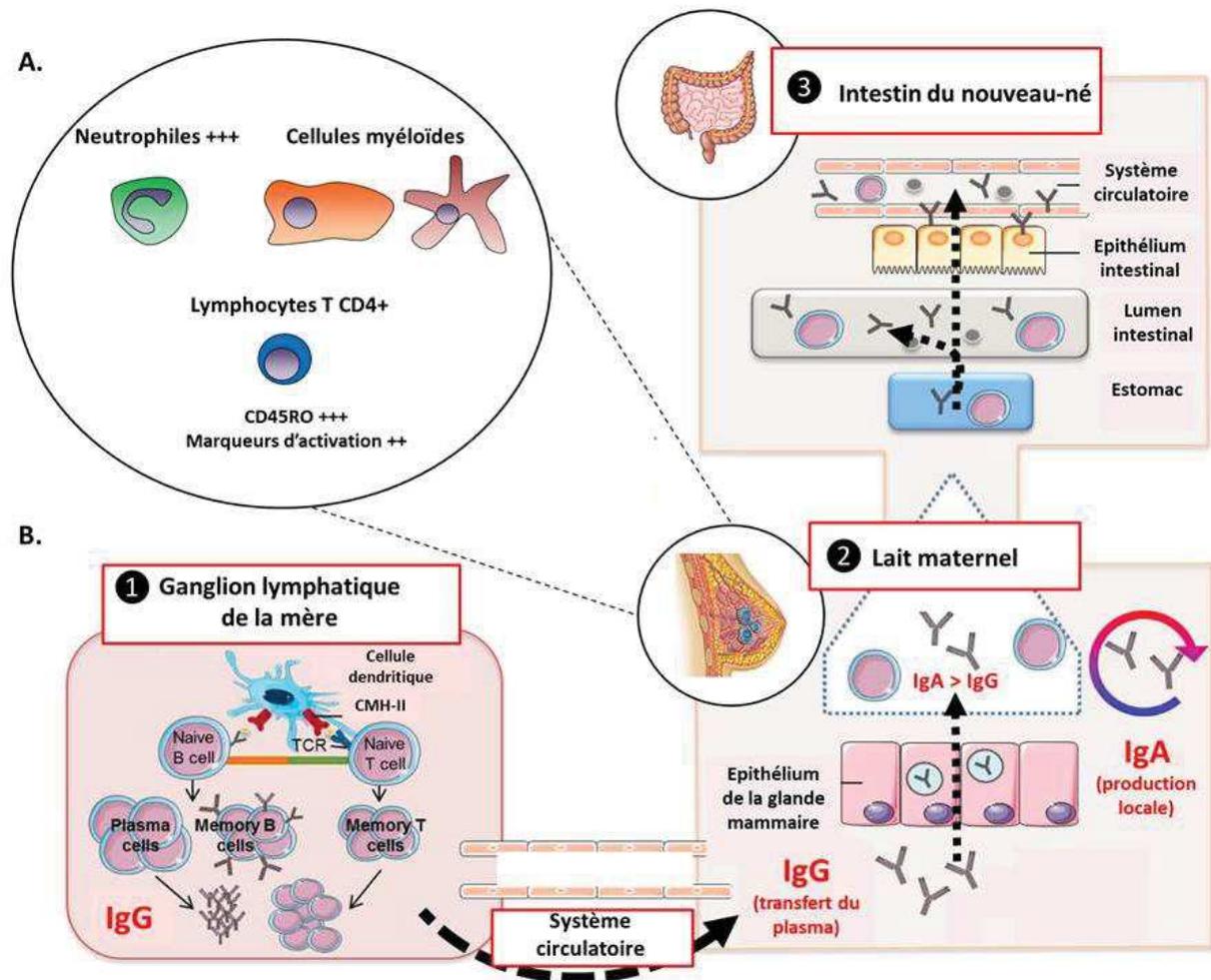


Figure 18 : Les anticorps de la mère sont transférés au nouveau-né via le lait maternel. A. Principaux types de cellules immunitaires retrouvées dans le lait maternel. **B.** Grandes étapes du transfert des anticorps de la mère à l'enfant via le lait maternel (Matías et al. 2017). **1** Les anticorps sont produits dans les centres germinaux des organes lymphoïdes secondaires. **2** Les IgG de la mère transitent dans le système circulatoire puis sont transférées à travers l'épithélium de la glande mammaire. Dans la glande mammaire, des IgA sont produites localement. **3** Transfert des IgG et des IgA maternels vers le nouveau-né via le lait maternel.

b. Réponse T CD8⁺ cytotoxique dirigée contre le VIH-1

La deuxième branche de l'immunité adaptative activée lors d'une infection virale est la réponse cytotoxique médiée par les lymphocytes T CD8⁺ activés. Les T CD8⁺ sont activés lors de la reconnaissance par leur TCR de peptides viraux présentés par les CMH de classe I à la surface des cellules infectées (Figure 19). Le CMH de classe I présente des peptides issus de la dégradation protéasomale de protéines virales ou de polypeptides viraux mal repliés. Cette reconnaissance induit une cascade de signalisation dans le lymphocyte T CD8⁺ menant à la libération de molécules cytotoxiques telles que les granzymes et les perforines, et à la sécrétion

de cytokines et de chémokines telles que l'IFN- γ , le TNF- α , MIP1 α /1 β et CCL5. Les composés libérés par les T CD8+ activés ont une action cytotoxique sur les cellules infectées, et sont de ce fait qualifiés de lymphocytes T cytotoxiques (CTL).

Les CTL constituent une population cellulaire clé dans la lutte contre l'infection par le VIH-1. L'apparition de CTL corréle avec une diminution de la virémie, et la diversité des CTL spécifiques du VIH-1 est corrélée avec le taux de T CD4+ et le contrôle de la réplication virale (Chouquet et al. 2002; Oxenius et al. 2004; Wang et al. 2009). Les T CD8+ apparaissent avant le pic de virémie plasmatique qui advient 2 à 3 semaines après le début de l'infection, et persistent durant la phase chronique de l'infection (McMichael et al. 2010). Contrairement aux T CD4+, le nombre de T CD8+ augmente progressivement au cours de l'infection en l'absence de traitement (Hellerstein et al. 1999; Kovacs et al. 2008). Cependant, les CTL portent des marqueurs d'épuisement tels que PD-1 et Tim-3 au cours de la phase chronique et ne contribuent donc pas efficacement au contrôle de l'infection (Borrow et al. 1994; Freeman et al. 2006; Lewis et al. 2012).

L'efficacité de la réponse T CD8+ contre le VIH-1 est très variable d'un patient à un autre, et plusieurs études ont suggéré une importance qualitative plus que quantitative de la réponse T CD8+ dans le contrôle de la réplication virale (Lambotte et al. 2005; Betts 2006; Sáez-Cirión et al. 2007b, 2007a). La spécificité antigénique des T CD8+ est également déterminante dans le contrôle de la réplication virale. En effet, les T CD8+ induisent une **pression de sélection** qui se traduit par l'émergence de variants viraux porteurs de mutations d'échappement dès les phases précoces de l'infection (Borrow et al. 1997; Goulder et al. 1997, 2001; Duda et al. 2009; Goonetilleke et al. 2009; Kawashima et al. 2009). Les T CD8+ exercent donc un effet antiviral persistant chez l'hôte, soit en induisant directement la mort des cellules infectées, soit indirectement en induisant des mutations d'échappement qui impactent la réplication virale. Ces mutations d'échappement sont cependant réversibles et disparaissent lors de leur transmission à des individus porteurs d'allèles HLA différents (Leslie et al. 2004; Kawashima et al. 2009).

Chez les patients infectés, une réponse T CD8+ est élicitée contre des peptides viraux issus des 3 polyprotéines (Gag, Pol, Env) et des 7 protéines auxiliaires et régulatrices (Tat, Rev, Vif, Vpr, Vpu, Nef, ASP) du VIH-1 (Cardinaud et al. 2009) (Figure 19). **Les deux études qui ont relaté la réponse T CD8+ dirigée contre ASP seront détaillées dans la partie III2c de l'introduction (Berger et al. 2015; Bet et al. 2015).** De toutes les protéines virales du VIH-1,

seuls les T CD8+ qui ciblent la protéine structurale Gag ont été retrouvés associés au contrôle de la réplication virale (Kiepiela et al. 2007). L'importance de la réponse T CD8+ anti-Gag dans le contrôle de la réplication virale est également illustrée par la protection conférée par les allèles de HLA classe I HLA B57 et HLA B07 dans l'infection par le VIH-1 (Kiepiela et al. 2004, 2007), qui a été associée à la présentation de peptides de Gag conservés et restreints par ces molécules de HLA (Altfeld et al. 2003; Dinges et al. 2010).

Parmi les 6 cadres de lecture potentiels des deux brins du génome proviral se trouvent également des **cadres de lectures alternatifs (ARF)** qui codent pour des séquences peptidiques qui ne sont pas incluses dans une protéine fonctionnelle. Les ARF résultent de l'usage différentiel des codons au cours de la traduction, probablement du fait d'un changement de cadre de lecture ribosomal ou de l'initiation de la traduction au niveau d'un codon initiateur alternatif (Met ou Cys). La traduction de ces ARF résulte en la production de peptides nommés **épitopes cryptiques** qui constituent une source additionnelle de peptides viraux présentés par le HLA de classe I (Ho et Green 2006). Plusieurs études ont rapporté l'existence d'ARF sur les deux brins du génome proviral du VIH-1 (Cardinaud et al. 2004; Garrison et al. 2009; Bansal et al. 2010; Champiat et al. 2012), et démontré l'existence d'une réponse cytotoxique ciblant différents épitopes cryptiques du VIH-1 (Cardinaud et al. 2004, 2009; Garrison et al. 2009; Bansal et al. 2010; Berger et al. 2010; Champiat et al. 2012) (Figure 19). Des mutations conférant un échappement aux CTL apparaissent dans la séquence des épitopes cryptiques au cours de l'infection (Bansal et al. 2010; Cardinaud et al. 2011), suggérant très fortement que les CTL qui ciblent les épitopes cryptiques *in vivo* exercent une pression de sélection sur le virus. Cardinaud et al ont rapporté que l'une des mutations qui affectait *in vivo* un épitope cryptique codé par l'un des ARF de Gag médiait l'échappement aux CTL en introduisant un site de clivage par le protéasome (Cardinaud et al. 2011). Une étude récente a cependant suggéré que les CTL qui ciblent les épitopes cryptiques ne contribuent que faiblement à la pression de sélection qui s'exerce sur le virus aux stades précoces de l'infection (Peng et al. 2018).

Enfin, aux protéines virales conventionnelles et aux épitopes cryptiques s'ajoute une 3^e source d'antigène viraux présentés aux T CD8+ : les peptides issus de la traduction du génome de provirus défectueux pour la réplication virale (Graf et al. 2013; Pollack et al. 2017) (Figure 19). Il existe donc une grande variété de peptides viraux générés par les cellules infectées qui et capables d'induire une réponse T cytotoxique. Bien que seule la réponse T CD8+ ciblant Gag ait été associée au contrôle de la réplication virale, il serait intéressant d'étudier l'impact de la

réponse T CD8⁺ ciblant les épitopes cryptiques et les peptides produits par les provirus défectueux sur la progression de la pathologie.

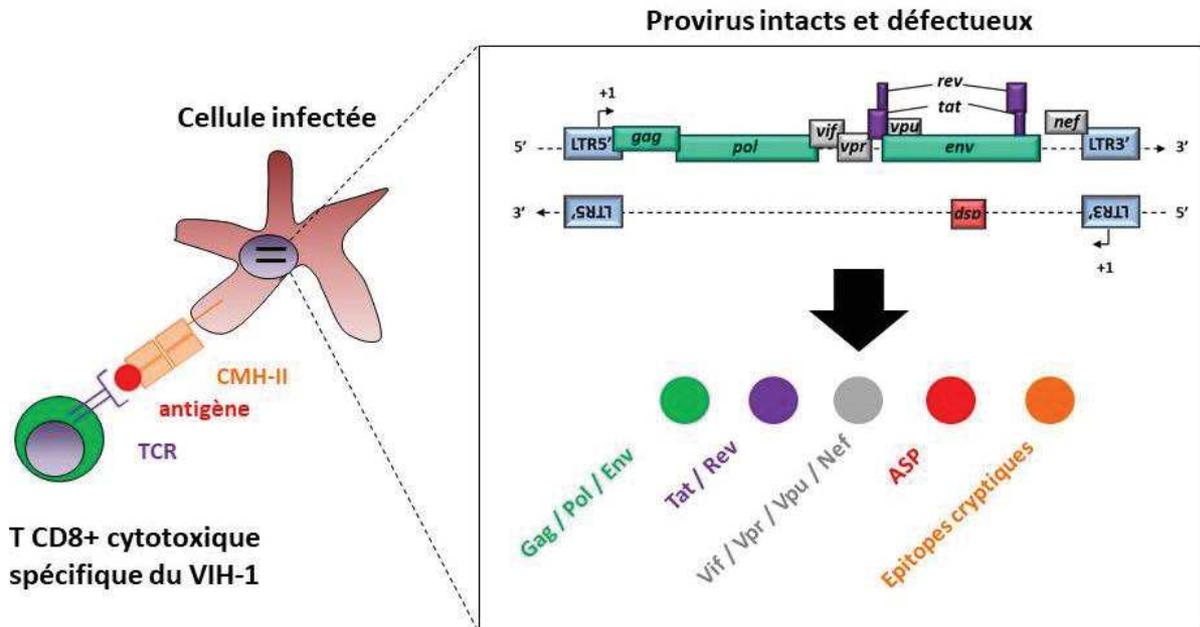


Figure 19 : Les peptides viraux issus de la traduction des 6 cadres de lecture des génomes proviraux intacts et défectueux du VIH-1 induisent potentiellement une réponse T CD8⁺ cytotoxique.

c. Patients qui contrôlent spontanément la réplication virale

En l'absence de traitement, la plupart des individus infectés par le VIH-1 développent une profonde immunodéficience et décèdent de complications liées au SIDA. Cependant, il existe des individus capables de contrôler la réplication du virus en l'absence de traitement. Parmi ces individus, deux phénotypes ont été décrits :

- Les patients qui contrôlent spontanément le virus après l'infection et en l'absence de tout traitement, qualifiés d'*Elite Controllers* (EC). Ils représentent moins de 1% de la population infectée.

- Les patients qui contrôlent le virus après interruption d'une thérapie anti-rétrovirale prolongée, qualifiés de *Post-Treatment Controllers* (PTC) (Hocqueloux et al. 2010). Ces individus représentent 5 à 20% des patients qui arrêtent le traitement antirétroviral.

Les EC et les PTC maintiennent une charge virale inférieure à 50-75 copies d'ARN/mL. Malgré les importantes retombées potentielles pour les recherches vaccinales et thérapeutiques actuelles, les déterminants à l'origine du contrôle de la réplication virale chez ces individus restent peu compris. Plusieurs études ont suggéré que les déterminants à l'origine de ce contrôle différaient pour les EC et les PTC (Goulder et Deeks 2018). Pour plus de clarté, je ne traiterai par la suite que des déterminants décrits pour les EC.

- **Facteurs viraux.** Plusieurs études ont rapporté la présence de mutations ou de délétions dans les gènes accessoires et régulateurs du VIH-1 (*rev*, *tat*, *vif*, *vpr*, *nef* et *vpu*) chez les individus EC (Alexander et al. 2000; Yamada et Iwamoto 2000), suggérant la circulation de virus atténués chez ces patients. A l'inverse, une étude plus récente a démontré que la capacité répliquative des virus des EC était similaire à celle de souches de laboratoire, et ce malgré la présence de mutations (Blankson et al. 2007).
- **Facteurs liés à l'hôte.** Malgré une importante hétérogénéité génétique et immunologique, certains facteurs intrinsèques sont fréquemment retrouvés parmi les EC.
 - **Facteurs génétiques.** Le polymorphisme CCR5 $\Delta 32$, caractérisé par une délétion dans le gène codant pour CCR5, confère une protection aux individus infectés qui en sont porteurs en affectant la capacité du virus à entrer dans les cellules par le biais du co-récepteur CCR5 (Dean et al. 1996). Par ailleurs, la fréquence des allèles protecteurs des gènes HLA de classe I HLA-B5701 et HLA-B27 est enrichie chez les EC (Kiepiela et al. 2004, 2007; Lambotte et al. 2005; Pereyra et al. 2008). Comme discuté précédemment, la protection conférée par ces allèles résiderait dans la capacité des molécule de HLA B57 et B27, à présenter une large variété de peptides viraux, à cibler des régions très conservées du VIH, ou encore à générer une réponse cytotoxique T CD8⁺ immuno-dominante (Altfeld et al. 2003).
 - **Facteurs immunologiques.** Plusieurs études ont rapporté que les EC possèdent une réponse cytotoxique efficace avec des CTL capables de proliférer, de produire des cytokines et des composés cytotoxiques et à éliminer les T CD4⁺ infectés (Lambotte et

al. 2005; Sáez-Ciri3n et al. 2007b, 2007a). Par ailleurs, les T CD8+ des EC cibleraient davantage la prot3eine structurale Gag que les autres prot3eines virales (Pereyra et al. 2008), favorisant ainsi l'apparition de mutations virales avec un fort c3ot3t r3epl3eicatif. Concernant l'immunit3e humorale, les EC pr3eésentent un plus faible taux d'anticorps neutralisants plasmatiques (Lambotte et al. 2009), mais un plus fort taux d'anticorps dou3es d'ADCC (Pereyra et al. 2008; Lambotte et al. 2009). Les taux d'IgG1 et d'IgG2 plasmatiques dirig3es contre la prot3eine virale p24 ont 3et3e associ3es au contr3ole de la r3epl3eication virale chez les EC (Ngo-Giang-Huong et al. 2001; Martinez et al. 2005). Outre les r3eponses humorale et cytotoxique, les EC se distinguent par un taux 3lev3e de T CD4+ par rapport aux individus non controllers.

En cons3equence du contr3ole de la r3epl3eication virale, la charge provirale des T CD4+ folliculaires et des T CD4+ m3emoires quiescentes serait plus faible chez les patients EC (Lambotte et al. 2009; Graf et al. 2013). Bien que la mesure de l'ADN proviral ne constitue pas une mesure ad3equate du r3eservoir latent, il a 3et3e sugg3er3e que le contr3ole de la r3epl3eication virale chez les individus EC permettrait de limiter la taille de leur r3eservoir viral.

4. Br3eve description des traitements actuels et th3erapies 3emergentes

a. Traitements actuels

Bien que la th3erapie antir3etrovirale (ART) ne permette pas d'3eradiquer les r3eservoirs viraux des patients, elle peut supprimer la r3epl3eication virale pendant plusieurs d3ecennies et augmente la dur3ee de vie des personnes infect3ees par le VIH, sous r3eserve d'une bonne adh3erence au traitement. La trith3erapie ou ART combin3ee consiste 3a combiner trois agents antir3etroviraux (ARV) (Larder et al. 1995; Collier et al. 1996; D'Aquila et al. 1996; Staszewski et al. 1996). Les ARV utilis3es en combinaison sont r3epartis en 6 classes : les inhibiteurs de TI non nucl3eosidiques, les inhibiteurs de TI nucl3eosidiques, les inhibiteurs d'int3egrase, les inhibiteurs de prot3ease, les inhibiteurs de fusion et les antagonistes de co-r3ecepteurs. Une combinaison d'un inhibiteur d'int3egrase et de deux inhibiteurs nucl3eosidiques de TI est g3en3eralement recommand3ee comme th3erapie initiale (Saag et al. 2018). L'essai de th3erapies initiales avec uniquement deux ARV est en cours d'investigation (Cahn et al. 2014; Raffi et al. 2014).

L'initiation précoce de l'ART réduit la taille du réservoir viral ainsi que l'activation des cellules immunitaires, protège contre l'infection des T CD4+ mémoires et diminue le nombre de variants viraux porteurs de mutations d'échappement (Ananworanich et al. 2012; Buzon et al. 2014; Chéret et al. 2015). Cependant, il a été suggéré que l'initiation très précoce de l'ART empêcherait la génération d'une réponse T mémoire anti-VIH-1 efficace, suggérant l'existence d'une **fenêtre temporelle optimale et limitée** pour initier l'ART qui reste à être définie (Goulder et Deeks 2018) (Figure 20).

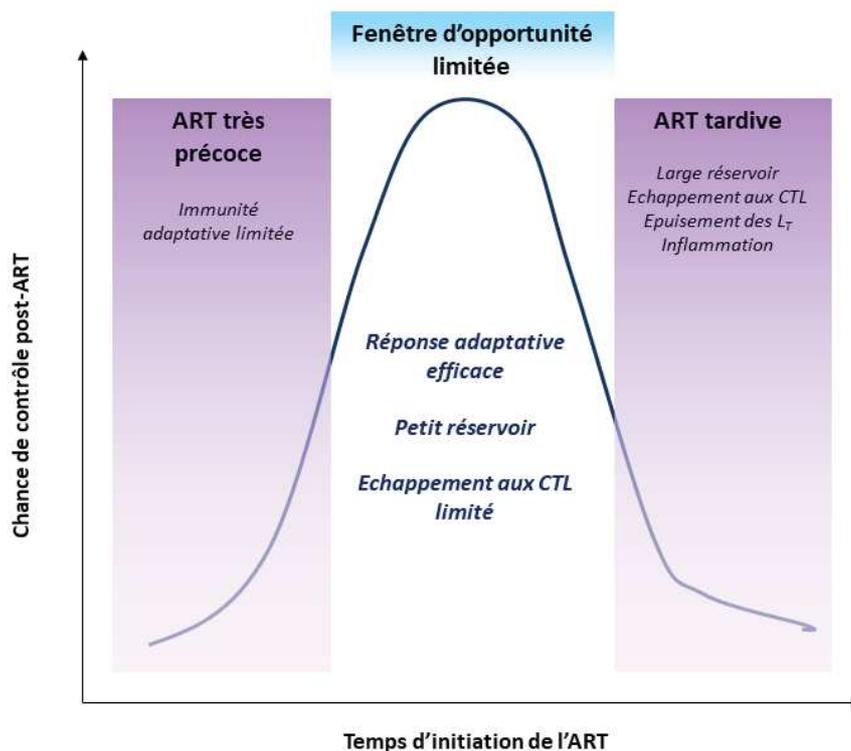


Figure 20: Fenêtre temporelle optimale pour initier l'ART chez les patients (Goulder et Deeks 2018).

L'ART ne restaure pas complètement l'état de quiescence immunitaire observé dans des conditions physiologiques. De plus, bien que l'initiation précoce de l'ART diminue la taille du réservoir, l'ART n'empêche pas sa mise en place et échoue à l'éradiquer. En conséquence, un rebond viral correspondant à la réactivation du réservoir latent chez les patients est rapidement observé après l'arrêt de l'ART. Enfin, la production de protéines virales par des provirus défectueux persiste à bas bruit même en présence d'ART, ce qui entretient l'inflammation chronique et la

dérégulation immunitaire causée par l'infection virale (DeMaster et al. 2015; Baxter et al. 2016; Pollack et al. 2017). L'émergence de mutations conférant des résistances aux ARV est également l'une des grandes limitations des traitements actuels (Günthard et al. 2016).

b. Les essais vaccinaux

Bien que les nouvelles stratégies de la PrEP et du TasP soient prometteuses, l'élaboration d'un **vaccin préventif** reste une priorité absolue. L'élaboration d'un vaccin contre le VIH-1 se heurte cependant à l'incroyable diversité génétique du virus et au fort taux de mutations de la transcriptase inverse du VIH-1. Enfin, aucun individu infecté par le VIH-1 n'a à ce jour développé une réponse immunitaire suffisamment efficace pour éliminer le virus, ce qui limite notre connaissance des réponses immunitaires à éliciter pour induire une protection efficace (Walker et Burton 2008).

Parmi les différents essais vaccinaux qui ont été réalisés jusqu'à présent, seul l'**essai clinique Thaïlandais RV144** a démontré une efficacité modeste. L'essai vaccinal RV144 consistait en 4 injections du vecteur ALVAC modifié pour exprimer les protéines Gag-Pro et le domaine d'ancrage gp41 du virus de sous-type B et la gp120 d'un virus AE (*prime*), suivies de 2 injections avec une molécule de gp120 soluble recombinante dérivée des sous-types B et AE (*boost*). L'essai clinique, réalisé sur plus de 16 000 sujets hétérosexuels Thaïlandais présentant des comportements à risque, a montré une protection chez environ 30% des patients (Rerks-Ngarm et al. 2009). Cependant, aucune différence significative du taux de T CD4+ et de la charge virale plasmatique n'a été rapportés entre les individus ayant contracté le VIH-1 dans le groupe Placebo et le groupe vacciné. Le succès partiel de ce vaccin, dont les déterminants immunologiques sont en cours d'évaluation, serait en partie dû à la présence d'IgG doués d'activité ADCC, mais ne serait pas dû à la présence d'anticorps neutralisants (Kim et al. 2015).

La protection conférée par l'injection d'anticorps neutralisants anti-VIH-1 chez les patients a été évaluée par plusieurs études. Une diminution transitoire de la virémie a été observée chez les patients suite à l'injection d'anticorps neutralisants (Stiegler et al. 2002; Armbruster et al. 2004; Mehandru et al. 2007). Bien que des mutants d'échappement à ces anticorps apparaissent fréquemment chez les patients, ces résultats suggèrent que l'injection d'anticorps neutralisants pourrait être utilisée en complément de l'ART chez les patients infectés (Halper-Stromberg et Nussenzweig 2016; Kumar et al. 2018).

c. Les stratégies d'éradication des réservoirs

L'établissement d'un réservoir latent à un stade très précoce de l'infection constitue l'un des obstacles majeurs à l'éradication du virus chez les individus infectés (Chun et al. 1995). De plus, le maintien du réservoir viral est assuré par des mécanismes de prolifération homéostatique cellulaire et d'expansion clonale, même après plusieurs années d'ART efficace (Chomont et al. 2009; Maldarelli et al. 2014). Deux stratégies principales visant à éradiquer (Shock and kill) et à contrôler (Lock and Block) le réservoir latent sont principalement envisagées.

- **La stratégie Shock and Kill** repose sur la réactivation des réservoirs latents (Shock) à l'aide d'un **agent réverseur de latence (LRA)**, qui sont souvent des inhibiteurs d'histones déacétylases, et la destruction des cellules réactivées (Kill) (Archin et Margolis 2014; Barouch et Deeks 2014). Selon un scénario optimal, les cellules réactivées produiraient des particules virales et seraient alors détectées puis lysées par les T CD8+, tandis que les infections *de novo* seraient bloquées par l'ART (Shan et al. 2012). Cependant, cette approche est limitée par le dysfonctionnement des CTL au cours de l'infection et par leur incapacité à cibler les cellules réservoirs qui ne portent aucun marqueur de leur infection (Ruiz et al. 2019).
- **La stratégie lock and block** qui vise à prévenir la ré-activation des réservoirs viraux en inhibant l'expression des provirus (Sadowski et Hashemi 2019). Cette approche permettrait d'arrêter l'ART des patients et de cibler spécifiquement les cellules infectées de manière latente pour « verrouiller » l'expression de gènes proviraux et ainsi éviter la ré-activation du réservoir latent.

Ces deux stratégies sont cependant limitées par notre méconnaissance actuelle de la diversité des réservoirs latents fonctionnels présents chez un individu ainsi que par le manque d'outils permettant la mesure de la réactivation de ces réservoirs (Pasternak et Berkhout 2018; Sengupta et Siliciano 2018).

Malgré les nombreux progrès dans la compréhension de la physiopathologie de l'infection par le VIH-1 depuis sa découverte, de nombreuses zones d'ombres subsistent. En particulier, notre méconnaissance de la nature des réservoirs latents et des réponses immunitaires à induire pour contrôler la réplication virale entravent le développement de traitements curatifs. Ces éléments, combinés à la grande diversité génétique des isolats viraux qui existent à l'échelle mondiale rendent impossible l'élaboration de vaccins préventifs ou curatifs. A l'heure actuelle, les programmes de prévention de la transmission du VIH-1 tels que le TasP et la PrEP restent donc la meilleure chance de juguler la pandémie.

III. ASP, la Protéine AntiSens du VIH-1 : étude du gène *asp*, des transcrits associés et de la protéine

1. Gène antisens et activité transcriptionnelle associée chez les rétrovirus

a. Considérations générales sur les gènes antisens

Définition

La notion de gène est complexe. Un gène est souvent assimilé au cadre de lecture ouvert (ORF) et aux régions promotrices, régulatrices et terminatrices nécessaires à la traduction d'une séquence d'ADN en protéine. Cependant, cette définition ne prend pas en considération les gènes non codants dont les transcrits exercent une fonction autre que celle de messenger, (ARN ribosomiaux, ARN de transfert, micro-ARN, petits ARN non codants et ARN longs non codants), et n'est pas adaptée au cas particulier des rétrovirus qui ne possèdent que deux séquences promotrices localisées dans les LTR 5' et 3'. Pour l'ensemble de ma thèse, je définirai donc un gène comme une portion d'ADN génomique (comprenant la séquence en tant que tel et les séquences régulatrices) destinée à être transcrite en un ARN fonctionnel.

La notion de gène anti-sens, littéralement en *sens contraire*, pré-suppose l'existence d'un référentiel sens, et est par conséquent relative. **Ainsi, un gène antisens l'est toujours relativement à un gène sens** (Figure 21A et B). Pour la suite de ma thèse, seront donc qualifiés d'antisens les gènes situés sur le brin antisens de l'ADN (proviral ou eucaryote), par opposition aux gènes localisés sur le brin sens de l'ADN.

Les gènes antisens, localisés par définition en recouvrement des gènes sens, sont donc des **gènes chevauchants**. L'existence de gènes antisens est rendue possible grâce aux propriétés du code génétique qui associe un unique acide aminé à une combinaison de trois nucléotides dans la séquence de l'ARN messenger. Il en découle trois cadres de lectures potentiels sur chaque brin d'ADN, soit 6 cadres de lecture sur l'ensemble des deux brins, pour une portion d'ADN donnée (Figure 21C). Théoriquement, chacun de ces 6 cadres de lecture peut présenter un cadre ouvert de lecture (ORF), défini par une séquence nucléotidique bordée par un codon d'initiation (AUG) et par un codon de terminaison (UAA, UAG ou UGA) de la traduction. Le potentiel codant des différents cadres de lecture d'une portion d'ADN est bien exploité par les rétrovirus dont 57% possèdent au moins un gène chevauchant dans leur génome (Belshaw et al. 2007), et

en particulier par le VIH-1 qui possède en plus du gène antisens *asp* des gènes sens en double (*gag/pol*, *pol/vif*, *vif/vpr*, *vpr/tat* et *env/vpu*,) et en triple (*tat/rev/env*) recouvrement (Figure 21A et B) (Keese et Gibbs 1992). Ces 6 cadres de lecture potentiels rendent également possible l'existence d'ARF codant pour des épitopes cryptiques. La présence d'ARF a été décrite dans le génome du VIH-1 et d'autres virus (Bullock et Eisenlohr 1996; Mayrand et al. 1998; Maness et al. 2007) (voir partie II3b de l'introduction).

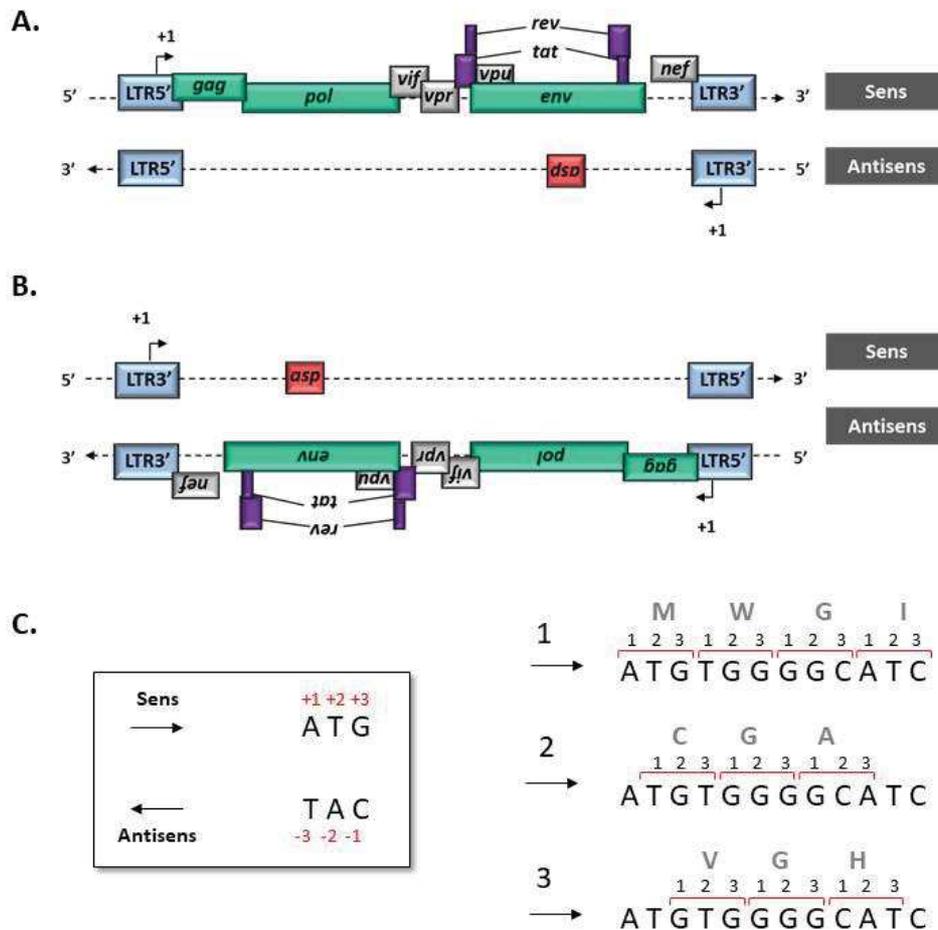


Figure 21 : La notion de gène antisens est relative et rendue possible par la propriété du code génétique. **A.** Représentation classique du génome proviral du VIH-1 : le brin d'ADN porteur des gènes *gag*, *pol*, *env*, *tat*, *rev*, *nef*, *vif*, *vpr* et *vpu* est qualifié de brin sens, tandis que le brin porteur du gène *asp* est qualifié d'antisens. **B.** Autre représentation possible du génome proviral du VIH-1 : le brin porteur d'*asp* est qualifié de sens, et le brin opposé d'antisens. **C. Partie gauche :** Représentation des 6 cadres de lecture potentiels à partir d'un codon. Les symboles + et - qui précèdent les numéros réfèrent à la polarité du brin d'ADN. La flèche indique le sens de lecture (de 5' en 3'). **Partie droite :** Les 3 cadres de lectures potentiels d'une même séquence nucléotidique sont représentés. La flèche indique le sens de lecture (de 5' en 3') et les chiffres 1, 2 et 3 le numéro du cadre de lecture.

Plusieurs études ont rapporté la présence de gènes antisens dans les génomes d'organismes eucaryotes et procaryotes. En particulier, des études transcriptomiques ont suggéré qu'environ 70% du génome humain génère des transcrits antisens (Katayama et al. 2005; He et al. 2008). L'existence de gènes antisens codants a également été décrite chez certains organismes procaryotes (Silby et Levy 2008; Fellner et al. 2014). **Cependant, sauf précision de ma part, je ferai uniquement référence aux gènes antisens rétroviraux dans la suite de l'introduction.**

Pourquoi créer des gènes en antisens ?

En créant des gènes antisens en recouvrement de leurs gènes sens, les rétrovirus augmentent la taille de leur transcriptome et de leur protéome sans augmenter la taille de leur génome, qui serait par ailleurs contrainte par la symétrie de leur capsid (Chirico et al. 2010). Cette hypothèse de compactage du génome a déjà été avancée pour expliquer la présence très fréquente de gènes chevauchants dans le génome des rétrovirus (Barrell et al. 1976; Belshaw et al. 2007).

Par ailleurs, la création de gènes en antisens permet l'expression de **transcrits et/ou de protéines qualifiés d'antisens** dont l'expression est contrôlée par un promoteur différent de celui des gènes sens. Par conséquent, les produits des gènes antisens peuvent agir comme des modulateurs de l'expression des gènes sens du génome proviral sans que cela affecte leur propre expression. Cette hypothèse a été confirmée dans le cas d'HTLV-1, pour lequel le transcrit d'*hbx* et la protéine HBZ sont tous les deux impliqués dans le contrôle de l'expression des gènes sens (Gaudray et al. 2002; Satou et al. 2006). Dans le cas du VIH-1, deux transcrits d'*asp* décrits *in vitro* ont été décrits pour induire une régulation épigénétique du promoteur situé dans le LTR 5' du VIH-1 (Kobayashi-Ishihara et al. 2012; Saayman et al. 2014; Zapata et al. 2017). En régulant l'expression des gènes sens, le transcrit d'*hbx*, la protéine HBZ ainsi que les transcrits d'*asp* sont probablement impliqués dans la persistance virale et dans l'échappement du virus au système immunitaire.

Chez les organismes eucaryotes, différents transcrits antisens ont également été décrits pour réprimer la transcription sens aux niveaux transcriptionnel (Rinn et al. 2007; Guttman et al. 2009; Khalil et al. 2009; Kotake et al. 2011) et post-transcriptionnel (Ogawa et al. 2008; Kim et al. 2009).

b. Activité transcriptionnelle antisens chez les rétrovirus

Historique de la découverte des gènes antisens chez les rétrovirus

En plus de leur LTR 5' qui contrôle l'expression des gènes sens rétroviraux nécessaires à la production de particules virales infectieuses, certains rétrovirus sont également capables de générer des transcrits antisens à partir de leur LTR 3' (Barbeau, Mesnard 2015). La découverte de l'ORF d'*asp* sur le brin antisens du VIH-1 a constitué la première évidence de l'existence d'un gène antisens chez les rétrovirus (Miller 1988), et a pour la première fois suggéré la production d'une protéine antisens à partir d'un génome rétroviral. Peu de temps après, plusieurs ORF potentiels ont également été décrits sur le brin antisens du génome proviral du HTLV-1, et différents transcrits antisens ont été détectés dans une lignée cellulaire infectée par HTLV-1 (Larocca et al. 1989). HTLV-1 est donc le premier rétrovirus pour lequel la présence de transcrits antisens a été démontrée. En 2001, un ORF a également été identifié sur le brin antisens du génome proviral de 21 isolats de Virus de l'Immunodéficience Féline (FIV) (Briquet et al. 2001). Cet ORF, localisé comme *asp* en recouvrement du gène *env*, coderait pour une protéine putative hautement hydrophobe de 103 acides aminés. Cependant, bien que cette étude ait également identifié un transcrit antisens dans différentes lignées cellulaires infectées *in vitro* et *ex vivo* par le FIV, le potentiel codant de ce transcrit antisens n'a jamais été démontré.

La protéine HTLV-1 Basic leucine Zipper (bZIP) factor HBZ est la première protéine rétrovirale codée par le brin antisens à avoir été découverte (Gaudray et al. 2002). Cette découverte a insufflé un souffle nouveau à la recherche sur les gènes rétroviraux antisens. En effet, la décennie suivante a été marquée par la découverte de gènes antisens chez les rétrovirus HTLV-2, HTLV-3 et HTLV-4 qui codent respectivement pour les protéines antisens APH-2 (*Antisense protein of HTLV-2*), APH-3 et APH-4 (Halin et al. 2009; Larocque et al. 2011). Un gène antisens codant a également été rapporté dans le génome du Virus de la Leucémie T Simien -1 (STLV-1) (Miura et al. 2013). Des transcrits antisens ont également été détectés dans des cellules infectées par les rétrovirus MLV (Rasmussen et al. 2010), BIV (Liu et al. 2015) et BLV (Durkin et al. 2016). Cependant, aucune protéine antisens associée à ces transcrits n'a à ce jour été rapportée.

En plus de l'ORF d'*asp*, une étude a rapporté en 2015 l'existence de 4 autres ORF sur le brin antisens du génome proviral du VIH-1 dont les produits induisent une réponse cytotoxique (Berger et al. 2015). D'autres études ont également rapporté le ciblage par des T CD8+

cytotoxiques d'épitopes cryptiques codés par des ARF en antisens des gènes *gag*, *pol* et *nef* du VIH-1 (Bansal et al. 2010; Peng et al. 2018). Ces études suggèrent que différents épitopes cryptiques et différentes protéines codés par le brin antisens du VIH-1 sont exprimés au cours de l'infection.

Régulation des transcriptions sens et antisens chez les rétrovirus : exemples du VIH-1 et du HTLV-1

Chez les rétrovirus VIH-1, HTLV-1 à 4 et FIV, l'activité transcriptionnelle antisens est initiée à partir du LTR 3' (Larocca et al. 1989; Michael et al. 1994; Briquet et al. 2001; Gaudray et al. 2002; Halin et al. 2009; Larocque et al. 2011). Le LTR de ces rétrovirus est donc **doté d'une activité promotrice bidirectionnelle**.

En utilisant un vecteur d'expression qui a permis de quantifier les activités transcriptionnelles sens et antisens des deux LTR du VIH-1 et du HTLV-1, notre équipe a confirmé la capacité de ces deux rétrovirus à initier la transcription aux deux extrémités de leur génome (Arpin-André et al. 2014). L'initiation des activités transcriptionnelles sens et antisens du VIH-1 dépendent de la liaison aux mêmes facteurs de transcription cellulaires (Figure 22), principalement NF-kB et Sp1 (Michael et al. 1994; Vanhée-Brossollet et al. 1995; Peeters et al. 1996; Landry et al. 2007; Kobayashi-Ishihara et al. 2012; Arpin-André et al. 2014). Dans le LTR du HTLV-1, les sites de liaison aux facteurs de transcription situés directement en amont des sites d'initiation des transcriptions sens et antisens sont différents (Figure 22). Par conséquent, le facteur cellulaire Sp1 ne stimule que la transcription antisens du HTLV-1, et le facteur cellulaire CREB-2 ne stimule que sa transcription sens (Livengood et Nyborg 2004; Satou et al. 2006; Gazon et al. 2012; Arpin-André et al. 2014). Pour les deux rétrovirus, les transactivateurs viraux Tat et Tax activent préférentiellement la transcription sens (Michael et al. 1994; Kobayashi-Ishihara et al. 2012; Laverdure et al. 2012; Arpin-André et al. 2014). L'absence d'impact de Tat sur la transcription antisens du VIH-1 est en accord avec l'absence de son élément de réponse (TAR) des transcrits antisens du VIH-1 qui ont été décrits jusqu'à présent (voir partie III2b de l'introduction).

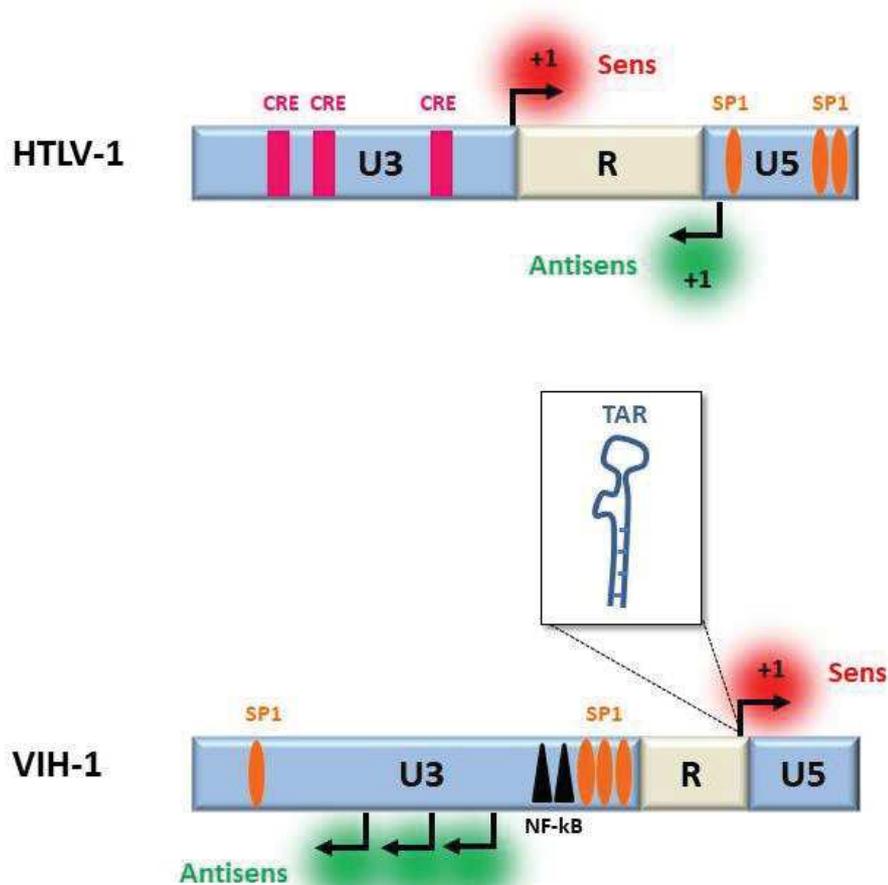


Figure 22 : Les LTR du HTLV-1 et du VIH-1 sont bidirectionnels et initient les transcriptions sens et antisens à chaque extrémité du génome proviral. CRE : Elément de réponse à CREB. L'élément de réponse de Tat (TAR) est présent sur les transcrits sens du VIH-1, mais absent des transcrits antisens.

Comme décrit pour les cellules eucaryotes (Adhya et Gottesman 1982; Callen et al. 2004; Shearwin et al. 2005), l'initiation concomitante des transcriptions sens et antisens du VIH-1 et du HTLV-1 pourrait induire un phénomène d'**interférence transcriptionnelle**, qui peut être défini comme l'activité répressive exercée en *cis* par un complexe transcriptionnel dominant sur un autre complexe transcriptionnel. Ce phénomène pourrait avoir lieu au niveau transcriptionnel via (i) la compétition pour la liaison de facteurs cellulaires communs ou (ii) lors de l'élongation convergente des transcrits sens et antisens, notamment par le biais de la collision des complexes de transcription (Prescott & Proudfoot, 2002). Une interférence pourrait également se produire au niveau post-transcriptionnel selon un mécanisme impliquant la

formation d'un duplex entre les deux transcrits analogue à celui décrit pour les siARN et les ARN PIWI des cellules eucaryotes (Kim et al. 2009).

Le VIH-1 et HTLV-1 présentent **un antagonisme des activités transcriptionnelles sens et antisens** (Barbeau, Mesnard 2015). Dans les cellules productrices de VIH-1 et d'HTLV-1, la transcription virale sens prévaut sur la transcription antisens (Vanhée-Brossollet et al. 1995; Landry et al. 2007; Kobayashi-Ishihara et al. 2012, 2018; Laverdure et al. 2012; Arpin-André et al. 2014). Pour le VIH-1 comme pour HTLV-1, l'activité transcriptionnelle antisens augmente lorsque le génome proviral est délété du LTR 5' (Klaver et Berkhout 1994; Cavanagh et al. 2006; Landry et al. 2007), suggérant une action répressive dominante exercée par la transcription sens sur la transcription antisens.

Dans les cellules de patients atteints de Leucémie lymphoïde Aigüe (ATL), une pathologie contractée chez moins de 5% des individus infectés par HTLV-1, le transcrit d'*hbz* est fortement exprimé tandis que celui de *tax* est indétectable (Belrose et al. 2011). Plus généralement, l'expression du transcrit d'*hbz* augmente dans les cellules infectées par HTLV-1, lorsque l'expression des transcrits sens de *tax* et de *gag* décline (Belrose et al. 2011; Liu et al. 2015). De plus, HBZ réprime l'expression du LTR 5' du HTLV-1 et active celle du LTR 3' (Gaudray et al. 2002; Clerc et al. 2008; Gazon et al. 2012), accentuant l'expression mutuellement exclusive de Tax et d'HBZ dans les cellules infectées.

Pour le VIH-1, notre équipe a détecté une activité transcriptionnelle antisens inférieure d'un facteur 1000 à l'activité transcriptionnelle sens dans des T CD4+ activés infectés *ex vivo*, mais uniquement d'un facteur 25-100 dans des macrophages et des DC infectés et dérivés *ex vivo* de monocytes (Laverdure et al. 2012). Les DC et les macrophages étant des cellules quiescentes, cette étude suggère que la transcription antisens du VIH-1 est préférentiellement active dans les cellules qui expriment naturellement de faibles quantités de transcrits viraux sens. Cette étude a en outre suggéré l'expression **mutuellement exclusive des transcrits sens et antisens du VIH-1** en rapportant l'expression majoritaire des transcrits antisens du VIH-1 dans les cellules infectées qui n'expriment pas la protéine Gag. A l'aide d'une lignée lymphoïde infectée *in vitro* de manière latente, une étude a récemment confirmé que les transcrits antisens du VIH-1 étaient exprimés dans des cellules qui dépourvues de transcription sens, mais a également rapporté la présence de cellules présentant les deux types de transcrits (Kobayashi-Ishihara et al. 2018).

Les mécanismes moléculaires et cellulaires à l'origine de la prévalence de la transcription sens sur la transcription antisens du VIH-1 et du HTLV-1 dans les cellules infectées n'ont pas été complètement élucidés et font probablement intervenir:

- La compétition pour la liaison des facteurs de transcription NF-kB et Sp1 dans le cas du VIH-1, et des facteurs d'élongation cellulaire pour les deux rétrovirus.
- L'activation préférentielle de la transcription sens par les protéines Tat et Tax.
- L'interférence transcriptionnelle induite par la collision de l'élongation convergente des transcrits sens et antisens.

2. ASP : de la découverte du gène aux fonctions potentielles

a. Découverte et conservation du gène *asp*

L'existence du gène *asp* a été pour la première fois proposée en 1988 (Miller 1988). En alignant les séquences du gène *env* de 12 isolats du VIH-1, RH Miller a en effet rapporté l'existence d'un cadre ouvert de lecture (ORF) conservé sur le brin antisens du génome proviral. Dès lors, il a été suggéré que ce gène codait pour une protéine hautement hydrophobe de 189 acides aminés, qui fut par la suite nommée **ASP pour AntiSense Protein** (Vanhée-Brossollet et al. 1995).

Le gène *asp* est situé dans le cadre de lecture -2 du gène *env* dont il est entièrement recouvrant (Miller 1988; Cassan et al. 2016) (Figure 23A). Le gène *env* du VIH-1 possède 5 régions hypervariables nommées V1 à V5 séparées par des régions constantes, ainsi que l'élément de réponse à la protéine Rev (RRE), qui est nécessaire à l'export nucléaire des transcrits non épissés et mono-épissés du VIH-1 (Figure 9 ; Figure 23A). Le gène *asp* recouvre les régions hypervariables V4 et V5 du gène *env*, et recouvre partiellement le RRE à son extrémité 5' (Figure 23A).

L'existence du gène *asp* est cependant restée controversée pendant près de 30 ans. En effet, la découverte d'un gène antisens allait à l'encontre du dogme stipulant que l'ensemble des gènes rétroviraux sont exprimés à partir d'un promoteur unique situé dans le LTR 5' (Barbeau, Mesnard 2015). De plus, le recouvrement d'*asp* avec le gène *env* rendait impossible sa caractérisation par les méthodes bio-informatique conventionnelles, basées sur la détection de

pressions de sélection sur une portion d'ADN donnée. Afin de contourner cette difficulté, notre équipe a développé une approche basée sur l'étude de l'apparition de codons initiateurs (start) et terminateurs (stop) de la traduction dans le cadre de lecture -2 du gène *env*, en collaboration avec le Laboratoire d'Informatique, de Robotique et de Microélectronique de Montpellier (LIRMM) (Cassan et al. 2016). En alignant les séquences de plus de 23 000 isolats viraux appartenant aux groupes M, N, O et P du VIH-1, mais également au VIH-2 et aux VIS gor et cpz à l'origine des 4 groupes phylogénétiques du VIH-1, cette étude a démontré que l'ORF d'*asp* était présent dans 77% des isolats du groupe M analysé, tandis qu'il était absent des VIS gor et cpz, du VIH-2, du groupe endémique O et des groupes rares N et P (Figure 23B). Ces résultats rapportent la conservation exclusive de l'ORF d'*asp* dans le groupe M du VIH-1 responsable de la pandémie, et suggèrent fortement que le gène *asp* est apparu de manière concomitante avec le groupe M au siècle dernier.

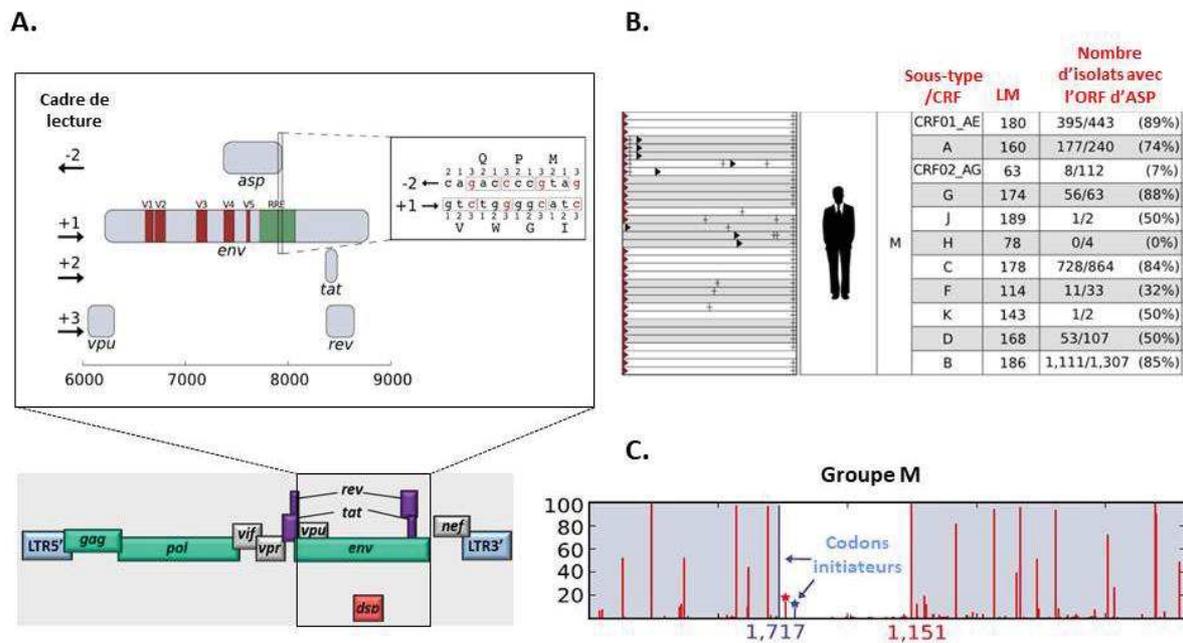


Figure 23 : Le gène *asp* est exclusivement conservé au sein du groupe pandémique M du VIH-1.

A. Représentation des cadres de lecture +1, +2, +3 (brin sens) et -2 (brin antisens) du gène *env* du VIH-1 (Cassan et al. 2016). **B.** Conservation de l'ORF d'*asp* déduite de l'alignement des séquences d'*env* d'isolats viraux des principaux sous-types et CRF du groupe M du VIH-1 (Cassan et al. 2016). LM : longueur moyenne. La conservation des codons d'initiation (triangles rouges et noirs) et de terminaison (croix) de la traduction dans l'ORF d'*asp* sont représentés. **C.** Pourcentages moyens de codons d'initiation (bleu) et de terminaison (rouge) de la traduction retrouvés dans l'ensemble des séquences *env* du groupe M. L'ORF d'*asp* est localisé dans le cadre de lecture -2 du gène *env* entre les nucléotides 1717 et 1151 (référence HXB2). Les étoiles indiquent les codons initiateurs et terminateurs de la traduction retrouvés dans l'ORF d'*asp* du sous-type A (Cassan et al. 2016).

Le codon start de l'ORF *asp* est conservé dans 97% des séquences du groupe M, et dans seulement 38% des séquences des groupes O, N et P (Figure 23C). Ce haut taux de conservation du codon start d'*asp* est une première indication de la pression de sélection exercée sur le gène *asp* dans le groupe M. Par ailleurs, les isolats viraux de sous-type A possèdent un codon stop au début de l'ORF d'*asp*, et ce codon stop est suivi dans 90% des cas d'un codon initiateur de la traduction alternatif, ce qui permet de maintenir l'ORF d'*asp* au sein du sous-type A (Figure 23C). Ces différents éléments rapportent donc **qu'une pression de sélection positive s'exerce sur le gène *asp* pour le maintenir au sein du groupe M**, ce qui est particulièrement visible dans le cas du sous-type A.

L'ORF d'*asp* est conservé dans 77% des isolats viraux du groupe M analysés, mais sa conservation varie entre les différents sous-types et CRF du VIH-1. En effet, l'ORF d'*asp* a été détecté dans respectivement 74%, 85% et 84% des isolats des sous-types A, B et C qui présentent une forte prévalence à l'échelle mondiale, et dans moins de 45% des isolats des sous-types D, F, J, H et K dont la prévalence est plus faible (Figure 5 ; Figure 23B et C) (Cassan et al. 2016; Hemelaar et al. 2019). En revanche, l'ORF d'*asp* n'est pas conservé dans le CRF02_AG, qui est surtout prévalent en Afrique de l'Ouest (Figure 5 ; Figure 23B et C). Les isolats de ce CRF présentent le même codon stop précoce que les isolats de sous-types A, mais ce codon n'est pas suivi d'un codon start alternatif.

Dans l'ensemble, cette étude a rapporté la création *de novo* du gène *asp* de manière concomitante **au groupe pandémique du VIH-1 au sein duquel il est exclusivement conservé**. Au sein du groupe M, le gène *asp* est plus particulièrement conservé dans les trois sous-types qui possèdent la plus forte prévalence mondiale. En outre, la pression de sélection positive qui s'exerce sur le gène *asp* **suggère fortement que les produits de ce gène confèrent un avantage évolutif au virus et ont été impliqués dans la propagation pandémique du groupe M**.

b. Le promoteur et les transcrits antisens associés à *asp*

Plusieurs transcrits antisens du VIH-1 ont été caractérisés dans des cellules transfectées ou infectées *in vitro*. Le premier rapport de transcrits antisens du VIH-1 dans une lignée cellulaire infectée remonte à 1990, soit deux années après la découverte du gène *asp* (Bukrinsky et Etkin 1990). En 1994, Michael et al détectent la présence de transcrits antisens du VIH-1 dans

différentes lignées cellulaire infectées et dans des PBMC de patients infectés (Michael et al. 1994). Dans une des lignée infectées, Michael et al caractérisent un transcrit antisens de 2.3 Kb (transcrit I) qui inclue l'ORF d'*asp* et présente un signal de poly-adénylation directement en aval du codon stop d'*asp* (Figure 24). Cette étude a été la première à identifier le LTR 3' du VIH-1 comme le promoteur à l'origine de l'expression des transcrit antisens du VIH-1. Peu de temps après, l'équipe de Catherine Vaquero confirme la détection de transcrits antisens contenant l'ORF d'*asp* dans des lignées myéloïdes et lymphoïdes infectées, et détecte pour la première fois par immuno-blotting une protéine de 19 kDa traduite *in vitro*, qu'ils nomment **ASP pour Protéine Antisens du VIH-1** (Vanhée-Brossollet et al. 1995).

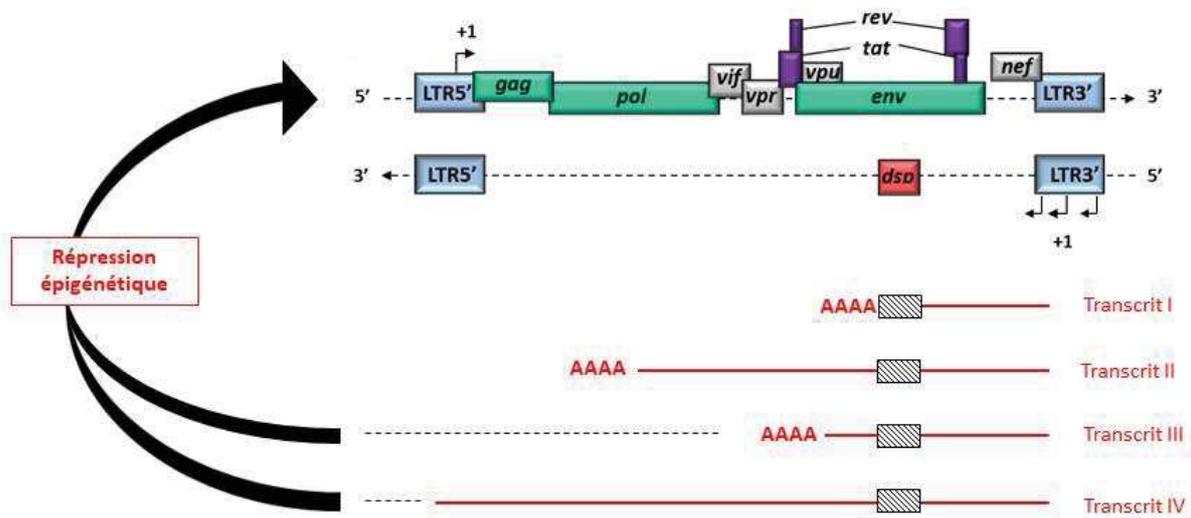


Figure 24 : Principaux transcrits d'*asp* caractérisés *in vitro*. Les transcrits I, II, III et IV désignent respectivement les transcrits décrits par Michael et al, Landry et al, Kobayashi et al et Saayman et al. Le rectangle grisé indique l'emplacement de l'ORF d'*asp* sur chaque transcrit. Les transcrits II et IV ont été associés à une répression épigénétique de l'activité promotrice du LTR 5'.

En 2007, notre équipe a développé une méthode de RT-PCR permettant l'amplification des ADNc issus de la transcription réverse spécifique des transcrits antisens, que je détaillerai dans la partie IIIa des résultats. A l'aide de cette technique, notre équipe a confirmé la présence de transcrits antisens du VIH-1 dans différentes lignées lymphoïdes et myéloïdes chroniquement infectées, ainsi que dans des HEK 293T transfectées avec pNL4.3. L'étude du transcrit d'*asp* détecté dans les HEK transfectées a par ailleurs mené à la caractérisation d'un transcrit de 5 Kb (transcrit II), différent de celui décrit auparavant par Michael et al (Figure 24). Ce transcrit inclus l'ORF d'*asp* et possède un signal de poly-adénylation localisé 2.4 kb en aval du codon

stop, dans la région complémentaire au gène *pol*. L'analyse des transcrits antisens a également révélé l'existence de plusieurs sites d'initiation de la transcription (TSS) localisés à l'extrémité 5' du LTR 3', contrairement aux deux transcrits d'*hbz* pour lesquels un unique TSS a été détecté dans la région U5 du LTR 3' (Larocca et al. 1989; Cavanagh et al. 2006) (Figure 24). L'absence de TATA box à proximité a été avancée comme l'une des causes possibles de cette multiplicité de TSS sur le brin antisens (Figure 24). En outre, et contrairement au transcrit majeur d'*hbz* (Cavanagh et al. 2006), aucun signal d'épissage n'a été détecté dans le transcrit de 5 Kb d'*asp*.

En 2012, la description d'un nouveau transcrit d'*asp* (transcrit III) a été rapportée dans une lignée de cellules Hela infectée (Kobayashi-Ishihara et al. 2012) (Figure 24). Ce transcrit, qui est long de 3 Kb, inclus l'ORF d'*asp*, possède un signal de poly-adénylation situé dans la région complémentaire au gène *env*, et est initié à partir de plusieurs TSS dans le LTR 3'. Une diminution de l'expression transcriptionnelle de *gag* et de la production de particules virales a été observée dans les cellules infectées exprimant ce transcrit, suggérant qu'il exerce un rôle inhibiteur dans la réplication virale.

Les mécanismes moléculaires responsables de cette inhibition ont été récemment élucidés : le transcrit III d'*asp* inhibe la réplication virale du VIH-1 au niveau transcriptionnel en recrutant le complexe modulateur de la chromatine PRC2 au niveau du LTR 5' (Zapata et al. 2017) (Figure 24). De plus, l'expression de ce transcrit prévient la ré-activation des cellules infectées de manière latente par des inhibiteurs de dé-acétylases. Bien que sa fonction codante ne puisse pas être exclue, la localisation nucléaire du transcrit III d'*asp* ainsi que son action répressive sur la réplication virale suggèrent fortement qu'il exerce une fonction indépendante de celle d'ASP, comme cela a déjà été décrit dans le cas du transcrit d'*hbz* (Satou et al. 2006).

Un rôle similaire de régulation de la réplication virale au niveau transcriptionnel a été suggéré pour une 4^e espèce de transcrit d'*asp* (transcrit IV), détecté dans des lignées lymphoïdes infectées de manière latente (Saayman et al. 2014) (Figure 24). Ce transcrit est recouvrant de l'ensemble du génome proviral du VIH-1, y compris du LTR 5'. Bien qu'il possède l'ORF d'*asp*, ce transcrit est dépourvu de signal de poly-adénylation, ce qui a amené Saayman et al à suggérer qu'il s'agissait d'un ARN long non codant. Le transcrit IV a été détecté au niveau du LTR 5' du VIH-1 dans les cellules infectées et agirait en recrutant des complexes épigénétiques modulateurs de la chromatine.

Récemment, deux études ont rapporté l'expression de transcrits d'*asp* dans les T CD4⁺ isolés de patients infectés (Zapata et al. 2017; Mancarella et al. 2019). Cependant, la nature des

transcrits détectés dans ces deux études n'a pas été caractérisée. Bien que l'existence *in vivo* des différents transcrits d'*asp* caractérisés *in vitro* n'ait pas été confirmée, les différentes études mentionnées ci-dessus suggèrent que certains transcrits d'*asp* sont impliqués dans le développement et le maintien de la latence virale. Par ailleurs, cette fonction peut être exercée indépendamment de l'expression de la protéine ASP, comme cela a déjà été décrit dans le cas du transcrit d'*hbz* (Satou et al. 2006; Kobayashi-Ishihara et al. 2012; Saayman et al. 2014; Zapata et al. 2017). Ces résultats n'excluent cependant ni le potentiel codant des transcrits d'*asp*, ni la possibilité qu'ils puissent également exercer une action répressive sur l'expression des gènes viraux au niveau post-transcriptionnel en formant un duplex avec les transcrits sens du VIH-1. Dans tous les cas, la répression de la transcription sens virale par les transcrits antisens pourrait, en diminuant l'interférence transcriptionnelle induite par la transcription sens du VIH-1, favoriser l'expression de la protéine ASP dans les cellules infectées.

c. ASP : tour d'horizon des connaissances actuelles

Le gène *asp* est apparu au début du siècle dernier, et son évolution est restreinte par la contrainte de codage imposée par *env* (Cassan et al. 2016). A l'inverse des gènes codant pour les autres protéines auxiliaires du VIH-1 qui ont été hérités du précurseur simien du VIH-1 (VIS cpz) (Cohen et al. 1988; Lim et al. 2012; Etienne et al. 2013b; Sauter et al. 2015), *asp* n'a pas bénéficié de plusieurs milliers d'années de co-évolution pour adapter son produit de traduction à la survie chez son hôte naturel. Son produit de traduction, ASP, est hautement hydrophobe et possède la capacité de s'oligomériser, ce qui induirait sa dégradation par autophagie (Torresilla et al. 2013; Liu et al. 2019). La difficulté à élaborer des systèmes d'expression permettant la détection ASP *in vitro* ainsi que le caractère novateur de la découverte d'un gène rétroviral antisens (Miller 1988) ont ralenti l'étude d'ASP pendant plusieurs années. Par ailleurs, l'étude d'ASP a également été entravée par son absence d'homologue connu (Cassan et al. 2016). La découverte d'HBZ en 2002 (Gaudray et al. 2002) a cependant suscité un regain d'intérêt pour ASP, et différentes études se sont penchées sur cette protéine au cours des deux dernières décennies. Dans cette partie, je rapporte les principales avancées des études qui ont été effectuées sur la protéine ASP depuis la découverte de son gène en 1988.

Structure d'ASP

ASP est une petite protéine de 189 acides aminés qui possède dans sa région centrale deux régions hautement hydrophobes prédites pour être transmembranaires (Miller 1988; Vanhée-Brossollet et al. 1995) (Figure 25). Du fait du recouvrement du gène *asp* avec le gène *env*, les différents domaines d'ASP sont inégalement conservés entre les sous-types et CRF du VIH-1. Les régions hypervariables codées par V5 et V4, qui sont respectivement situées dans la région centrale et à l'extrémité C-terminale d'ASP (Figure 25), sont soumises à de fortes variations de séquence entre les différents sous-types et CRF du VIH-1. A l'inverse, l'extrémité N-terminale d'ASP, qui est codée par la région du gène *asp* recouvrante du RRE (Figure 25), est bien conservée parmi les sous-types et CRF du VIH-1, à l'exception du sous-type A et de ses recombinants (Figure 26).

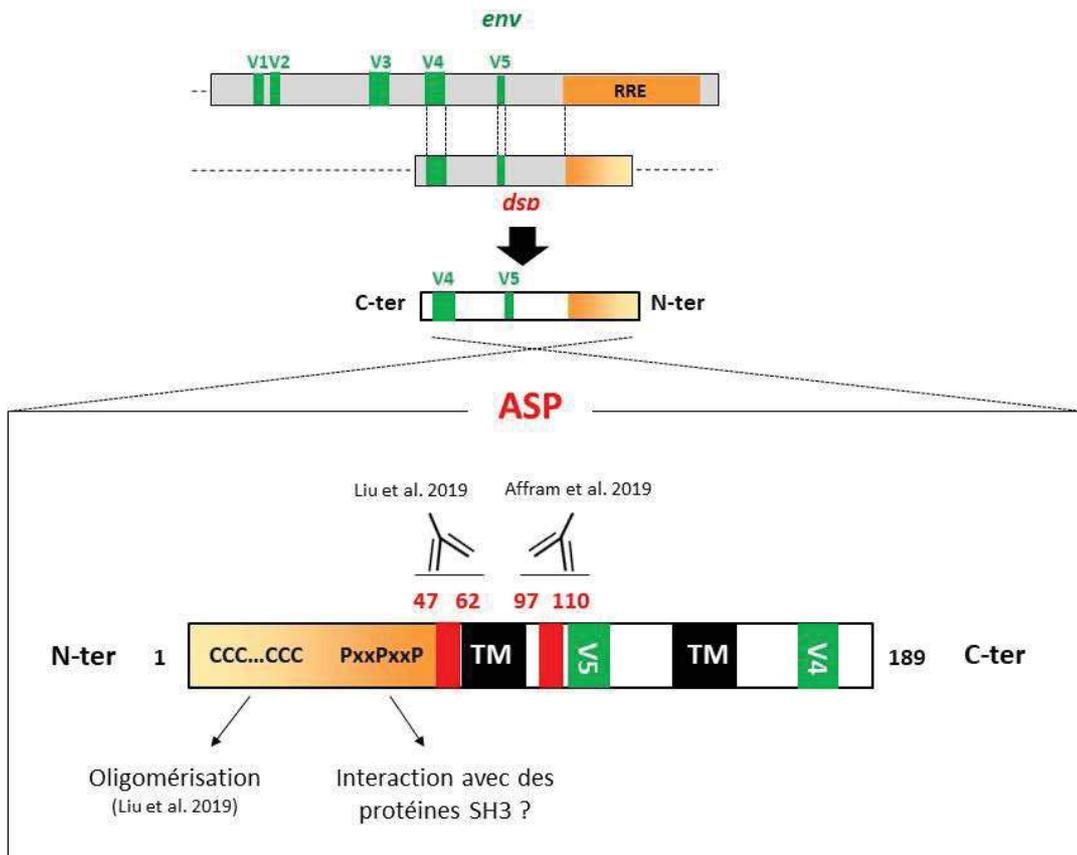


Figure 25 : Structure primaire d'ASP, la Protéine Antisens du VIH-1. Les épitopes des anticorps monoclonaux utilisés dans les études de Liu et al et Affram et al sont indiqués (Affram et al. 2019; Liu et al. 2019). PxxP : domaine riche en prolines. CCC : triplet de cystéines. TM : transmembranaire.

L'extrémité N-terminale d'ASP comprend deux triplets de cystéines et un motif riche en prolines (Clerc et al. 2011) (PxxP, Figure 25). La capacité d'ASP à s'oligomériser a été récemment attribuée aux deux triplets de cystéines d'ASP (Liu et al. 2019). Cependant, bien que l'oligomérisation d'ASP ait été avancée comme l'un des facteurs responsables de son instabilité dans les lignées cellulaires étudiées *in vitro* et notamment de sa dégradation par autophagie (Torresilla et al. 2013; Liu et al. 2019), les conséquences fonctionnelles de cette oligomérisation n'ont pas encore été déterminées. Les motifs riches en cystéines pourraient également constituer de potentiels sites de palmitoylation, comme cela a été décrit au sein de notre équipe pour la protéine Tat (Chopard et al. 2018). Les motifs PxxP ont été décrits pour être les principales cibles de liaison des protéines porteuses d'un domaine SH3 (Mayer 2001; Musacchio 2002). Les domaines SH3 ont été associés à une grande variété d'activités, et sont notamment retrouvés dans les protéines kinases associées à différentes voies de signalisation cellulaire (Kurochkina et Guha 2012).

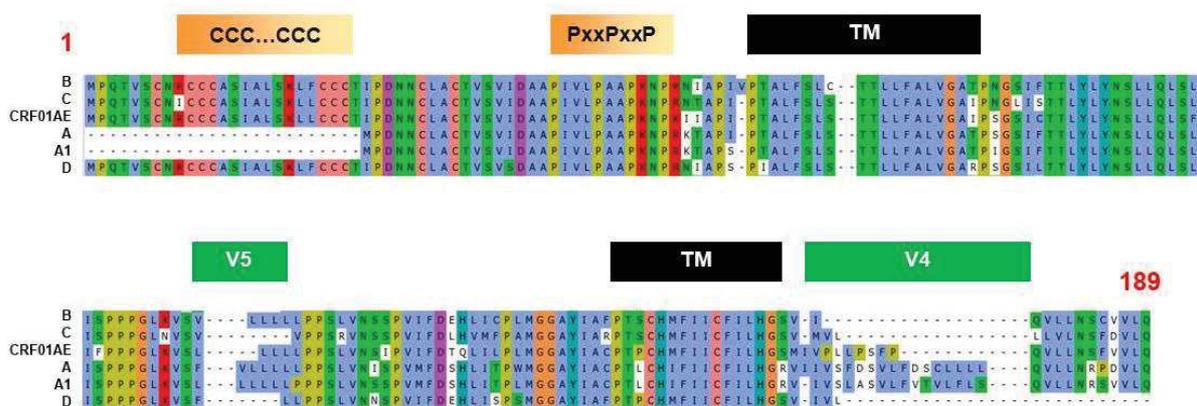


Figure 26 : Alignement des séquences protéiques consensus d'ASP des principaux sous-types et CRF du groupe M du VIH-1 présentant l'ORF d'ASP. L'alignement a été réalisé par le logiciel Clustal W. Les principaux domaines d'ASP sont représentés. PxxP : domaine riche en prolines. CCC : triplet de cystéines. TM : transmembranaire

Bien que la fonction d'ASP soit inconnue, la présence d'un motif PxxP conservé suggère qu'ASP pourrait être impliquée dans certaines voies de signalisation cellulaire, et ainsi permettre de détourner certaines voies de signalisation à son profit. Un projet de recherche actuellement en cours au sein de notre équipe vise à déterminer (i) l'interactome cellulaire

d'ASP, **(ii)** les domaines d'ASP impliqués dans ces interactions et **(iii)** les implications fonctionnelles de ces interactions.

Evolution des outils de détection d'ASP in vitro

Comme mentionné précédemment, l'étude d'ASP a longtemps été entravée par le manque d'outils adaptés à son expression et à sa détection *in vitro*. La toute première détection d'ASP a été réalisée en 1995 par l'équipe de Catherine Vaquero (Vanhée-Brossollet et al. 1995). Dans cette étude, une version d'ASP traduite *in vitro* a été détectée par immuno-blot après immuno-précipitation par des sera de patients infectés. Quelques années plus tard, la même équipe a détecté ASP par microscopie électronique dans une lignée de T CD4+ infectée en utilisant du sérum de lapins pré-immunisés avec des peptides d'ASP (Briquet et Vaquero 2002). Une dizaine d'années plus tard, notre équipe a confirmé la détection d'ASP dans une lignée T infectée *in vitro* puis dans des cellules primaires infectées *ex vivo* en utilisant un anticorps anti-Flag (Clerc et al. 2011; Laverdure et al. 2012). Le développement d'une **séquence codante d'ASP optimisée** (ASP opt) pour son expression en cellules de mammifères a par la suite permis d'optimiser sa détection *in vitro* (Torresilla et al. 2013). En utilisant ASP opt, l'équipe du Pr Benoît Barbeau a en effet détecté ASP dans une lignée simienne transfectée en utilisant trois techniques différentes : par cytométrie en flux, par western-blot et par microscopie confocale (Torresilla et al. 2013; Liu et al. 2019).

En 2012, notre équipe a développé un **anticorps monoclonal** de souris ciblant les résidus 47-62 d'ASP, une région prédite pour être hydrophile (Figure 25). En utilisant cet anticorps monoclonal, l'équipe du Pr Benoît Barbeau a récemment détecté par western-blot et par microscopie confocale la protéine ASP codée par différents sous-types du VIH-1 dans une lignée simienne transfectée (Liu et al. 2019). En utilisant un anticorps monoclonal différent dirigé contre les résidus 97-110 d'ASP (Figure 25), une autre équipe a pour la première fois détecté par cytométrie en flux et par microscopie la protéine **ASP exprimée de manière endogène** dans des lignées cellulaires chroniquement infectées par le VIH-1 (Affram et al. 2019).

Localisation subcellulaire d'ASP

Du fait de son hydrophobicité (Figure 25), ASP a été prédite pour être transmembranaire dès sa découverte (Miller 1988). En 1995, Vanhée-brossollet et al. ont suggéré qu'ASP puisse être incorporée dans la particule virale (Vanhée-Brossollet et al. 1995). Cette supposition a été confirmée en 2002 par la même équipe (Briquet et Vaquero 2002), puis très récemment par la **détection d'ASP dans les particules virales** de lignées myéloïdes et lymphoïdes chroniquement infectées (Affram et al. 2019) (Figure 27). En accord avec la prédiction initiale de RH Miller, notre équipe a rapporté la **localisation polarisée d'ASP à la membrane plasmique** de cellules primaires infectées *ex vivo* et de cellules lymphoïdes transfectées *in vitro* (Clerc et al. 2011; Laverdure et al. 2012). ASP a également été détectée sous forme ponctuelle dans le cytoplasme de cellules simiennes transfectées (Torresilla et al. 2013; Liu et al. 2019). Dans ces deux études, ASP co-localise avec LC3-II et p62 au sein des structures ponctuées, suggérant qu'il s'agit d'**autophagosomes** (Figure 27).

ASP ne serait cependant pas toujours associée à des membranes cellulaires. En effet, ASP a également été décrite **dans le noyau** d'une lignée lymphoïde infectée *in vitro* (Briquet et Vaquero 2002) et dans le noyau de lignées lymphoïdes et myéloïdes chroniquement infectées (Affram et al. 2019) (Figure 27). Dans l'étude d'Affram et al, ASP possède une **localisation subnucléaire polarisée** et ne co-localise pas avec le marqueur de l'hétérochromatine H3K27me, suggérant sa localisation préférentielle au niveau de structures chromatiniennes transcriptionnellement actives.

Dans leur étude récente, Affram et al ont rapporté la **localisation subcellulaire différentielle** d'ASP dans les cellules chroniquement infectées ré-activées ou non par traitement avec un activateur de la voie NF-kB (Affram et al. 2019). Localisée dans le noyau des cellules avant ré-activation, ASP serait relocalisée dans le cytoplasme et à la membrane plasmique des cellules après activation. Dans les cellules activées, ASP co-localise avec Gp120 à la membrane plasmique, d'où elle serait par la suite **incorporée dans les particules virales** (Figure 27).

Contrairement à HBZ qui est exclusivement nucléaire (Hivin et al. 2005, 2007; Clerc et al. 2009), ASP semble donc posséder différentes localisations cellulaires potentielles. Aucun signal de localisation nucléaire (NLS) n'ayant été détecté chez ASP, son import nucléaire pourrait être médié par son interaction avec une protéine cellulaire ou virale possédant un NLS. Bien que l'étude d'Affram et al suggère un lien potentiel entre la localisation d'ASP et le niveau

d'activation de la cellule, les conséquences fonctionnelles des différentes localisations subcellulaires d'ASP restent à être élucidées.

Fonctions potentielles d'ASP

Bien que sa fonction dans l'infection par le VIH-1 reste largement méconnue, différentes hypothèses peuvent être émises (i) du profil de la conservation du gène *asp* (Cassan et al. 2016), (ii) des différentes localisations cellulaires d'ASP qui ont été décrites jusqu'à présent, et (iii) de l'étude de la protéine antisens HBZ du HTLV-1, dont l'expression semble posséder certaines similitudes avec celle d'ASP (Barbeau, Mesnard 2015).

Comme mentionné précédemment, la conservation du gène *asp* dans le groupe M, et plus particulièrement dans les sous-types à forte prévalence suggère que les produits du gène *asp* ont été impliqués dans sa **propagation pandémique** (Cassan et al. 2016). De plus, la pression de sélection positive qui s'exerce sur ce gène suggère que les transcrits d'*asp* et/ou ASP confèrent un avantage évolutif au VIH-1, potentiellement en **favorisant sa dissémination ou en augmentant sa virulence** (Cassan et al. 2016). En outre, les gènes rétroviraux créés *de novo* jouent souvent un rôle dans la pathogénicité et la propagation virale (Sabath et al. 2012; Pavesi et al. 2018), comme illustré dans le cas des gènes *rex*, *p12* et *p30* du HTLV-1 (Pavesi et al. 2013) et les gènes *rev*, *vpu* et *tat* (exon 3') du VIH-1 (Keese et Gibbs 1992).

La dissémination du VIH-1 au sein d'une population est maximisée par son échappement au système immunitaire de l'hôte. Trois stratégies principales sont employées par le VIH-1 pour échapper à la surveillance du système immunitaire : (i) le blocage de facteurs impliqués dans la défense cellulaire, notamment par le biais de ses protéines auxiliaires, (ii) l'altération de la fonction des cellules infectées qui résulte en une dérégulation globale du système immunitaire et (iii) l'établissement d'un état de latence virale. Les protéines auxiliaires du VIH-1 sont toutes impliquées dans l'échappement du virus au système immunitaire (Figure 9), mais aucune n'a à ce jour été décrite pour être impliquée dans le développement ou le maintien de la latence virale. En revanche, HBZ a été décrite comme une protéine clé dans l'établissement et le maintien de la latence du HTLV-1, notamment en réprimant l'expression des gènes viraux sens à partir du LTR 5' (Gaudray et al. 2002; Clerc et al. 2008; Barbeau, Mesnard 2015). Un rôle similaire a également été décrit pour le transcrit d'*hbz* (Satou et al. 2006). En outre, HBZ est également impliquée dans la dérégulation de la réponse immune en induisant la différenciation des T CD4+ infectés en lymphocytes T régulateurs (Satou et al. 2011).

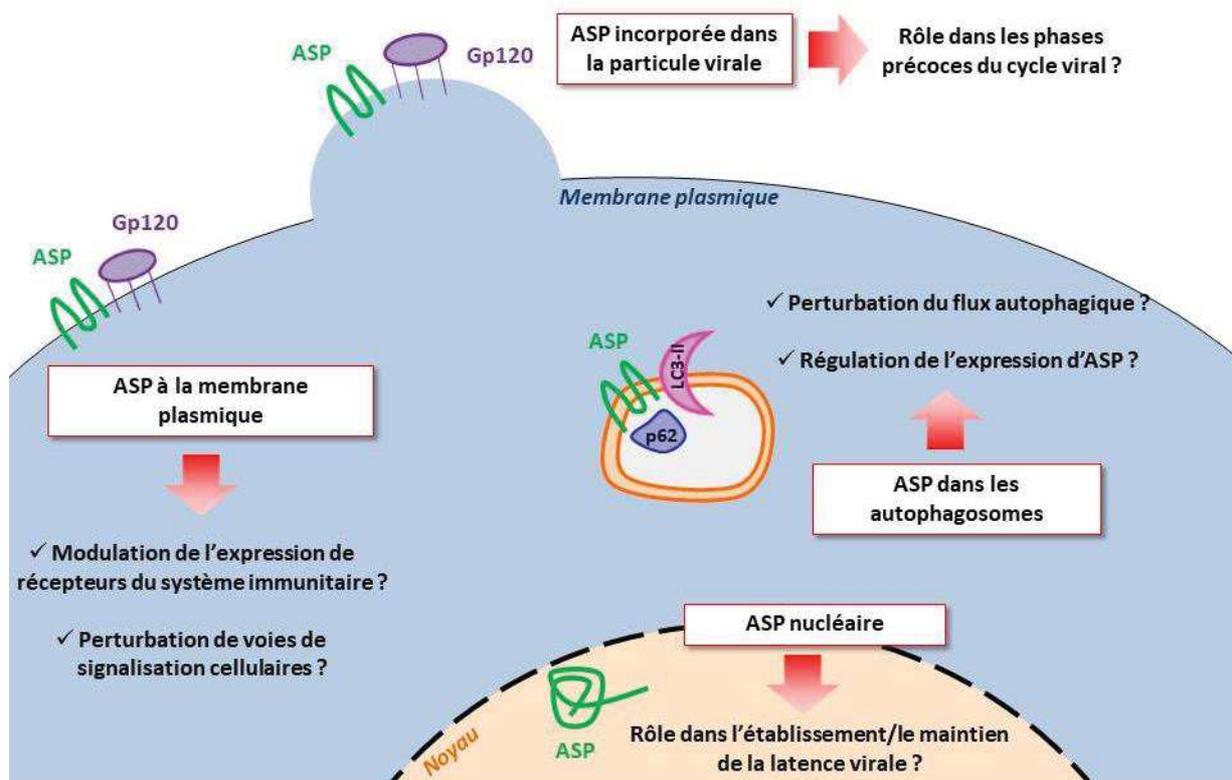


Figure 27 : Différentes localisations subcellulaires décrites pour ASP et hypothèses sur les fonctions potentielles des différentes formes d'ASP dans la cellule.

A l'instar d'HBZ, ASP pourrait donc exercer un rôle dans **l'établissement et le maintien de la latence virale** du VIH-1 ou dans la **dérégulation du système immunitaire**. A la membrane plasmique des cellules infectées, ASP pourrait moduler l'expression de récepteurs immunitaires comme cela a été décrit pour les protéines Vif, Nef et Vpu (voir partie I3d de l'introduction), ou encore interférer avec certaines voies de signalisation cellulaires en interagissant avec des protéines SH3 par le biais de son motif PxxP (Figure 27). La forte activité transcriptionnelle antisens détectée dans les macrophages et les DC dérivés de monocytes (Laverdure et al. 2012) suggère qu'ASP pourrait potentiellement exercer un rôle dans ces types cellulaires. Dans le noyau, ASP pourrait contribuer à la latence virale, par exemple en interagissant avec différentes protéines impliquées dans la régulation de l'expression génique (Figure 27). Deux des transcrits d'*asp* caractérisés *in vitro* répriment de manière épigénétique l'activité transcriptionnelle du promoteur 5' du VIH-1 (Figure 24) (Kobayashi-Ishihara et al. 2012; Saayman et al. 2014; Zapata et al. 2017). La transcription antisens du VIH-1 étant préférentiellement active dans les cellules présentant une faible transcription virale en sens, les

transcrits d'*asp* pourraient agir comme des interrupteurs moléculaires en induisant la production d'ASP, qui pourrait alors contribuer au maintien de la latence virale.

Par ailleurs, la détection d'ASP dans (i) des lignées chroniquement infectées et ré-activées et (ii) dans les particules virales produites par ces cellules suggère qu'ASP peut être exprimée au cours du cycle viral et exercer une **fonction à un stade précoce du cycle** (Figure 27). En accord avec cette hypothèse, notre équipe a au préalable rapporté une diminution de la quantité de p24 dans le surnageant de culture d'une lignée T transfectée avec une version de pNL4.3 qui présente une mutation abortive dans l'ORF d'ASP (Clerc et al. 2011). Une diminution de la quantité de la p24 a également été observée dans le surnageant de culture d'une lignée monocyttaire infectée par des virus présentant une autre mutation abortive dans l'ORF d'ASP (Torresilla et al. 2013). Bien que ces résultats aient été obtenus de lignées cellulaires transfectées ou infectées *in vitro*, un rôle d'ASP dans la réplication virale du VIH-1 ne peut pas être totalement écarté.

Enfin, ASP a été décrite pour **perturber le flux autophagique** dans une lignée cellulaire simienne transfectée, potentiellement en interagissant avec LC3-II et avec p62, une protéine adaptatrice impliquée dans l'autophagie sélective des protéines ubiquitylées (Torresilla et al. 2013; Liu et al. 2019). Ces deux études ont fortement suggéré la **dégradation d'ASP par autophagie**, qui pourrait être l'un des mécanismes élaborés par le virus pour réguler l'expression d'ASP (Figure 27). La mutation des triplets de cystéines d'ASP qui sont nécessaires à son oligomérisation diminue la perturbation du flux autophagique des cellules (Liu et al. 2019). Il est donc possible que l'oligomérisation d'ASP médie sa dégradation par autophagie sélective, et que cette dégradation perturbe le flux de la cellule (Torresilla et al. 2013; Liu et al. 2019). L'étude de Liu et al suggère que la perturbation du flux autophagique est une caractéristique d'ASP conservée à travers les différents sous-types du VIH-1. Les protéines Tat, Nef et Vif ont également été décrites pour perturber le flux autophagique des cellules infectées (Borel et al. 2015; Liu et al. 2017).

Cependant, le sous-type A, qui code pour une version d'ASP raccourcie en N-terminal et dépourvue de triplets de cystéines (Cassan et al. 2016) (Figure 26), possède une capacité à s'oligomériser nettement inférieure à celle des autres sous-types du groupe M analysés (Liu et al. 2019). En outre, l'émergence du sous-type A a été plus tardive que celle des sous-types B et C du VIH-1, ce qui amené notre équipe à suggérer que le sous-type A coderait pour une version évoluée d'ASP (Cassan et al. 2016). Bien que les fonctions associées à l'oligomérisation d'ASP

soient inconnues, cette hypothèse suggérerait alors que la perte de la capacité d'ASP à s'oligomériser confère un avantage évolutif au virus.

A l'instar des autres protéines auxiliaires du VIH-1, ASP est probablement une protéine multifonctionnelle. Les différentes études décrites ci-dessus suggèrent qu'ASP **pourrait exercer des fonctions différentes en fonction du stade de l'infection de la cellule** : ASP pourrait favoriser la réplication virale aux stades précoces, et au contraire favoriser le maintien de la latence virale une fois établie. En outre, ASP pourrait être impliquée dans la dérégulation des cellules infectées en perturbant (i) le flux autophagique de la cellule, (ii) les voies de signalisation cellulaire ou (iii) l'expression de récepteurs immunitaires.

ASP est immunogène et exprimée au cours de l'infection par le VIH-1

ASP a été détectée en surexpression dans des cellules infectées et transfectées *in vitro* et *ex vivo* (Briquet et Vaquero 2002; Clerc et al. 2011; Laverdure et al. 2012; Torresilla et al. 2013; Liu et al. 2019). Très récemment, l'expression d'ASP endogène a été rapportée dans des lignées chroniquement infectées par le VIH-1 (Affram et al. 2019). L'expression d'ASP endogène n'a encore jamais été détectée dans des cellules isolées de patients infectés. Cependant, 3 études ont rapporté des preuves de l'expression d'ASP chez le patient ainsi que de son immunogénicité.

En 1995, l'équipe de Catherine Vaquero a détecté une bande à la taille attendue de 19 KDa sur un immuno-blot en immuno-précipitant une protéine ASP traduite *in vitro* avec le sera de 15 individus infectés (Vanhée-Brossollet et al. 1995). **Pour la première fois depuis la découverte de l'ORF d'*asp* en 1988, ces résultats attestent l'expression d'ASP *in vivo* au cours de l'infection.** Cependant, si cette étude a mentionné l'absence de signaux détectables par immuno-blot en utilisant des sera de patients séronégatifs, ces résultats n'ont pas été publiés.

En 2015, soit 20 ans après le premier rapport de la présence d'anticorps anti-ASP *in vivo*, deux études indépendantes ont publié la présence de T CD8+ cytotoxiques ciblant différents peptides d'ASP parmi les PBMC d'individus infectés par le VIH-1 (Berger et al. 2015; Bet et al. 2015). En utilisant un panel de peptides chevauchants de l'ensemble de la séquence d'ASP, les équipes d'Arnaud Moris et de Paul Goepfert ont détecté des T CD8+ dirigés contre ASP chez 30% (8/25) des patients étudiés (Bet et al. 2015). Cependant, la fréquence des individus présentant une réponse cytotoxique anti-ASP a probablement été sous-estimée dans cette étude

car les patients analysés étaient sous ART. Cette étude a également rapporté la détection exclusive de T CD8+ ciblant deux peptides d'ASP restreints par des molécules de CMH-I chez les patients porteurs des allèles HLA-A correspondants. Enfin, par la détection de différentes cytokines et chémokines intracellulaires dans les T CD8+ activés par ces deux peptides d'ASP, cette étude suggère fortement que la réponse T CD8+ cytotoxique qui cible ASP est fonctionnelle *in vivo*.

L'étude menée par Berger et al a également rapporté la présence de T CD8+ ciblant un ensemble de peptides chevauchants d'ASP, mais aussi de protéines putativement codées par 4 autres ORF antisens potentiels du VIH-1 (Berger et al. 2015). Une réponse T CD8+ cytotoxique a été détectée contre des peptides chevauchants d'ASP et des 4 protéines antisens potentielles du VIH-1. Dans cette étude, la plupart des réponses cytotoxiques détectées étaient dirigées contre ASP et contre la protéine putativement codée par un ORF antisens localisé en recouvrement du gène *pol*. Cette étude suggère donc que des protéines et peptides autres qu'ASP sont codés par le brin antisens du VIH-1, ce qui est en accord avec d'autres études qui ont suggéré l'expression d'épitopes cryptiques par les 6 cadres de lectures du génome proviral du VIH-1 (Bansal et al. 2010; Champiat et al. 2012; Peng et al. 2018).

Ces trois études suggèrent fortement qu'ASP est exprimée au cours de l'infection *in vivo* et constitue une source d'antigènes reconnus par la réponse anticorps et la réponse T CD8+ cytotoxique des patients. En outre, la détection de T CD8+ ciblant des peptides chevauchants de l'ensemble de la séquence d'ASP suggère que le gène *asp* initialement décrit par RH Miller code effectivement pour une protéine de 189 acides aminés (Berger et al. 2015; Bet et al. 2015). Les phases de l'infection du VIH-1 au cours desquelles ASP est préférentiellement exprimée restent cependant à être déterminées.

Les deux dernières décennies ont été marquées par un intérêt croissant pour l'activité transcriptionnelle antisens, chez les rétrovirus comme chez les eucaryotes. Souvent cantonnée à un rôle de régulation de l'expression des gènes sens, l'étude du gène *hbz* du HTLV-1 et de sa protéine associée ont révélé que l'activité transcriptionnelle antisens pouvait résulter en la traduction d'une protéine polyfonctionnelle. Bien qu'ASP ait été moins étudiée qu'HBZ, plusieurs études attestent de son expression *in vivo* au cours de l'infection. L'évolution des outils utilisés pour exprimer et pour détecter ASP ont permis sa description à différents emplacements dans la cellule, et suggèrent son implication potentielle dans différents processus cellulaires. Malgré ces avancées, ASP reste peut considérée par la communauté scientifique.

Présentation du projet

I. Contexte scientifique global autour d'ASP et bref état des lieux des projets et des contrats actuels de l'équipe sur ASP

Lorsque j'ai débuté ma thèse en octobre 2015, le contexte scientifique global autour d'ASP était différent de ce qu'il est aujourd'hui. En effet, **(i)** ASP avait uniquement été détectée en surexpression dans des lignées cellulaires transfectées *in vitro* (Briquet et Vaquero 2002; Clerc et al. 2011; Torresilla et al. 2013) ou dans des cellules primaires infectées *ex vivo* (Laverdure et al 2012) à l'aide d'anticorps dirigés contre des séquences tag, **(ii)** les études rapportant l'existence d'une réponse T CD8+ ciblant ASP chez des patients infectés venaient tout juste de paraître (Berger et al. 2015; Bet et al. 2015), et **(iii)** l'étude décrivant la conservation unique du gène *asp* au sein du groupe pandémique du VIH-1 était encore en cours (Cassan et al. 2016).

Dans ce contexte "ASP-ien" particulier, notre équipe a développé **une approche translationnelle visant à étudier l'expression des produits du gène *asp* (transcrit et protéine) *in vivo* dans le contexte naturel de l'infection par le VIH-1.** Cette approche translationnelle s'est notamment concrétisée par le lancement de **mon projet de thèse**, initié en octobre 2015 suite à l'obtention d'une bourse de thèse translationnelle CHU-Université de Montpellier auprès de l'école doctorale CBS2, puis prolongé en 2019 par l'obtention d'une quatrième année de thèse financée par Sidaction.

Mon projet de thèse s'articulait autour de deux axes principaux :

1. La détection et la caractérisation de la **réponse anticorps anti-ASP** chez le patient.
2. La détection et l'étude du profil d'expression des **transcrits d'*asp*** dans les cellules de patients.

Ces deux axes s'inscrivaient dans la démarche scientifique globale développée par l'équipe qui visait à **(i)** appuyer l'existence et l'expression des produits du gène *asp* (transcrit et protéine) au cours de l'infection *in vivo* et à **(ii)** apporter des éléments de réponse quant à leur fonction potentielle. L'apport potentiel en connaissances fondamentales sur ASP ainsi que les potentielles retombées cliniques des deux axes de recherche de mon projet de thèse (étude des **anticorps anti-ASP** et des **transcrits d'*asp***) sont détaillés dans les **parties II et III** de la présentation du projet.

En mars 2019, l'axe de recherche translationnel portant sur l'étude du transcrit d'*asp* s'est enrichi d'un nouveau projet initié suite à l'obtention d'un contrat de pré-maturation auprès de l'Institut des Sciences Biologiques du CNRS (INSB). Ce contrat est actuellement mené par Margaux Mombled (Ingénieure d'étude).

Outre l'approche translationnelle qui a fait l'objet de mon projet de thèse et l'approche *in silico* qui a fait l'objet de la thèse d'Elodie Cassan (Cassan et al. 2016), l'étude d'ASP au sein de l'équipe a été renforcée en 2017 par le développement d'un troisième axe de recherche basé sur une approche fondamentale de protéomique. Ce projet de recherche est actuellement mené par Christophe Chopard (Post-doctorant).

II. Les potentiels apports en connaissances fondamentales sur ASP de mon projet de thèse

Outre la confirmation de l'existence d'ASP et de ses transcrits *in vivo*, l'étude de la **réponse anticorps anti-ASP** et des **transcrits d'*asp*** pouvait potentiellement apporter des éléments de réponse relatifs :

- Aux **types cellulaires** qui expriment préférentiellement les transcrits d'*asp* chez le patient. Notre équipe avait au préalable rapporté l'expression préférentielle des transcrits antisens du VIH-1 dans des cellules présentant une faible activité transcriptionnelle virale sens. Cependant, ces résultats ont été obtenus dans des cellules primaires infectées *ex vivo* (Laverdure et al. 2012) et des lignées cellulaires transfectées ou infectées *in vitro* (Landry et al. 2007), et nécessitaient donc d'être confirmés par l'étude des **transcrits d'*asp*** dans des cellules isolées de patients infectés.
- A l'immunogénicité des différents domaines d'ASP, et donc à leur **exposition potentielle au système immunitaire *in vivo***.
- A la **temporalité de l'expression** d'ASP au cours de l'infection naturelle par le VIH-1, inconnue à ce jour, bien que l'étude publiée par Bet et al en collaboration avec notre équipe suggère qu'ASP est exprimée au cours de la phase chronique de l'infection (Bet et al. 2015). Le suivi de de la **réponse anticorps anti-ASP** au cours des différents phases

de l'infection naturelle chez les patients permettrait d'apporter de nouveaux éléments de réponse, en partant du postulat que la présence d'anticorps anti-ASP reflète l'expression contemporaine d'ASP par les cellules infectées.

III. Les potentielles retombées cliniques de mon projet de thèse

L'étude comparée de la charge virale plasmatique et du taux de T CD4+ de patients présentant des profils immuno-virologiques diverses (patients *Elite Controller* et progressseurs, patients virémiques et avirémiques, patients sous ART et non traités) avec (i) le niveau d'expression du **transcrit d'asp** et (ii) l'intensité de leur **réponse anticorps anti-ASP** pourrait permettre une meilleure compréhension du lien potentiel existant entre ces différents paramètres *in vivo*. En fonction des (éventuelles) associations observées entre ces paramètres, notre projet pourrait à terme avoir **deux retombées cliniques principales**:

- L'emploi de la **réponse anticorps-ASP** et/ou du **transcrit d'asp** comme **biomarqueur de l'évolution de la pathologie**, si un lien entre ces paramètres et la CV/le taux de T CD4+ venait à se dessiner. L'emploi potentiel d'ASP comme biomarqueur pour le suivi de l'infection par le VIH-1 a fait l'objet du **dépôt d'un brevet** intitulé "Utilisation de la Protéine Antisens (ASP) du VIH-1 dans le diagnostic et le suivi de l'infection par le VIH-1" auprès du CNRS. Ce brevet est actuellement en cours de révision.
- Si la **réponse anticorps anti-ASP** s'avérait associée à une **évolution clinique favorable** (contrôle de la réplication virale et maintien ou hausse du taux de T CD4+), l'utilisation de tout ou partie de la protéine ASP pourrait être envisagée pour de **futurs essais vaccinaux**. Dans cette optique, la détermination du potentiel immunogène des différentes régions d'ASP s'avérerait particulièrement utile. Enfin, bien que mon projet de thèse ne puisse, dans le meilleur des cas, que constituer les prémices d'une telle retombée clinique, cette éventualité est particulièrement intéressante à envisager dans la mesure où le potentiel immunogène des peptides codés par le brin antisens du génome proviral du VIH-1 a été jusqu'à présent sous-exploité.

IV. Techniques utilisées pour mener à bien le projet et plan des résultats

Lorsque j'ai débuté ma thèse, les outils et protocoles employés pour **(i)** exprimer ASP dans des lignées cellulaires et **(ii)** détecter la protéine par western-blot et immuno-fluorescence étaient encore soumis à des optimisations. La réalisation de mon projet a donc au préalable nécessité une importante phase de développement technologique, au cours de laquelle j'ai développé une technique de **RT-qPCR brin-spécifique** pour détecter le **transcrit d'asp** dans les cellules de patients, et une **technique basée sur l'immuno-précipitation d'une protéine de fusion entre une luciférase et ASP** (*Luciferase Immuno-Precipitation System* ou LIPS) pour détecter les **anticorps anti-ASP** dans des échantillons biologiques (plasma et lait maternel) de patients.

J'ai opté pour une segmentation assez classique de mes résultats en deux parties : une **première partie** qui relate les résultats obtenus de l'étude de la **réponse anticorps anti-ASP** dans les échantillons biologiques de patients, et **une deuxième partie** qui rapporte les résultats obtenus de l'étude du **transcrit d'asp** dans les cellules de patients.

Résultats

I. Caractérisation de la réponse anticorps dirigée contre ASP chez le patient

L'étude conduite par Vanhée-Brossollet et al en 1995 avait au préalable suggéré la présence d'anticorps anti-ASP dans le sérum de patients infectés par le VIH-1 (Vanhée-Brossollet et al. 1995). Cependant, ces résultats n'avaient jamais été confirmés par une autre étude. J'ai donc recherché la présence d'anticorps anti-ASP dans des échantillons biologiques de patients infectés dans l'objectif: de **(i)** confirmer l'existence d'anticorps anti-ASP chez les patients infectés, **(ii)** d'analyser l'immunogénicité des différents domaines d'ASP *in vivo*, et **(iii)** d'analyser le lien potentiel entre la réponse anticorps anti-ASP, la charge virale plasmatique (CV) et le taux de T CD4+ des patients.

Pour rechercher la présence d'anticorps anti-ASP dans les échantillons biologiques de patients, j'ai dans un premier temps développé un système de détection basé sur l'immuno-précipitation en phase liquide d'une protéine de fusion recombinante entre une luciférase et ASP (*Luciferase Immuno-Precipitation System* ou LIPS). En effet, il n'existe pas de test commercial permettant de détecter les anticorps anti-ASP chez le patient, et la technique LIPS présentait plusieurs avantages sur les techniques classiques d'ELISA : une sensibilité accrue, une bonne spécificité, et la possibilité de détecter des épitopes conformationnels en utilisant la protéine entière comme antigène (Burbelo et al. 2005). Après avoir testé ce système de détection à l'aide d'un anticorps monoclonal dirigé contre ASP, j'ai utilisé le LIPS pour rechercher la présence d'anticorps anti-ASP dans des échantillons biologiques (plasma et lait maternel) de différents groupes de patients infectés par le VIH-1.

J'ai ainsi analysé la présence d'anticorps anti-ASP dans **(i)** le plasma et le lait maternel de patientes ayant interrompu la prise d'agents rétroviraux (ARV) administrés à des fins prophylactiques (cohorte ANRS 12174), **(ii)** dans le plasma de patients sous ART (patients en consultation au CHU de Montpellier), et **(iii)** dans le plasma de patients naïfs de tout traitement, présentant soit un contrôle spontané de la réplication virale (patients *Elite Controller* ; cohorte ANRS CODEX), soit une progression classique de la maladie (cohorte ANRS SEROCO). Chez les patients présentant des anticorps anti-ASP, j'ai ensuite étudié la dynamique de la réponse anticorps anti-ASP au cours du temps, puis je l'ai comparée à celle de la CV et du taux de T CD4+ des patients. Enfin, j'ai analysé la contribution des différents domaines d'ASP à l'épitope ciblé par les anticorps de ces patients, en utilisant comme antigènes des mutants d'ASP tronqués de différents domaines.

1. Développement d'une technique permettant de détecter les anticorps dirigés contre ASP dans des échantillons de patients

a. Principe de la technique LIPS et choix de l'antigène

La technique LIPS permet la reconnaissance en phase liquide **d'anticorps dirigés contre un antigène d'intérêt fusionné à une protéine luminescente**. Après expression de la protéine de fusion luciférase-antigène par des cellules eucaryotes, les cellules sont lysées et le lysat obtenu est incubé avec des échantillons biologiques de patients contenant éventuellement des anticorps dirigés contre l'antigène. Les complexes anticorps/antigènes sont ensuite immunoprécipités à l'aide de billes couplées à des protéines chimériques A/G qui possèdent une forte affinité pour le fragment Fc des IgG. La quantité d'antigènes capturés par les anticorps est mesurée par l'ajout du substrat de la luciférase, ce qui résulte en l'apparition d'un signal luminescent (Figure 28).

Le LIPS, à l'origine décrite comme une technique de diagnostic possédant les avantages de la radio-immunoprécipitation sans les inconvénients de la radio-activité (Burbelo et al. 2005), a depuis été utilisée pour détecter les anticorps dirigés contre un large panel d'antigènes viraux, et a notamment permis de détecter des anticorps dirigés contre la protéine HBZ chez le patient (Burbelo et al. 2007, 2014; Enose-Akahata et al. 2013; Furuta et al. 2015).

La technique LIPS présente plusieurs avantages. Tout d'abord, l'utilisation de la luciférase comme système de révélation permet l'obtention d'un bon rapport signal sur bruit et assure une bonne spécificité. Ensuite, la reconnaissance anticorps/antigène en phase liquide permet l'utilisation de la protéine entière comme antigène, et donc la détection d'épitopes conformationnels. Enfin, l'absence d'étape de purification préalable de l'antigène permet de réaliser le LIPS à partir de petites quantités d'antigène. L'antigène peut donc être produit en cellules eucaryotes humaines, ce qui favorise son repliement correct ainsi que l'intégrité de ses modifications post-traductionnelles.

Au protocole initialement décrit par Burbelo et al. (Burbelo et al. 2009), j'ai apporté deux modifications principales : le nombre de lavages (**voir partie III2c du matériel et méthodes**) et la nature de la luciférase fusionnée à l'antigène d'intérêt. J'ai en effet utilisé comme antigène une protéine de fusion entre la nanoluciférase et ASP (nano-ASP), contrairement au protocole initial de Burbelo et al qui préconisait l'utilisation de la *renilla* luciférase. Une étude parue

récemment a également utilisé la nanoluciférase dans le LIPS pour détecter des anticorps dirigés contre l'insuline dans le sérum d'individus diabétiques (Ling et al. 2018).

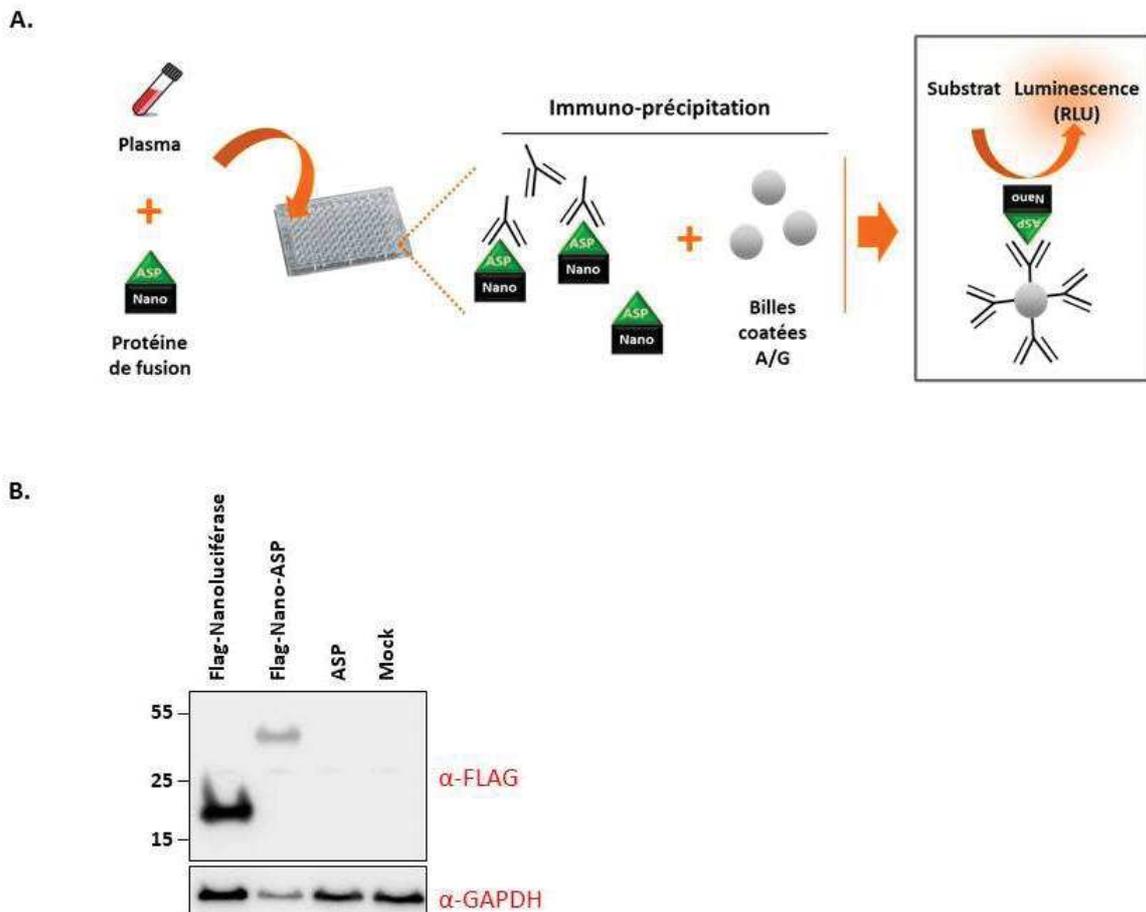


Figure 28 : Développement de la technique LIPS (*Luciferase Immunoprecipitation System*) pour détecter des anticorps anti-ASP dans les échantillons biologiques de patients infectés par le VIH-1. **A. Principales étapes de la technique LIPS. La présence d'anticorps anti-ASP est révélée par l'ajout du substrat de la nano fusionnée à ASP (nano-ASP). **B.** Détection par immuno-blot de la nano seule ou fusionnée à ASP (nano-ASP). Le signal est révélé avec un anticorps qui reconnaît la séquence Flag située en N-terminal de la nano.**

Lors de l'initiation du projet, les outils permettant l'expression d'ASP *in vitro* étaient en cours de développement, et la séquence d'ASP du clone moléculaire pNL4.3 (Adachi et al. 1986) était la seule dont nous disposions au laboratoire. Nous avons donc choisi d'utiliser cette séquence d'ASP de sous-type B pour détecter la présence d'anticorps anti-ASP dans des échantillons de patients.

b. Test du LIPS avec un anticorps monoclonal dirigé contre ASP

J'ai dans un premier temps effectué le LIPS en incubant la nano-ASP ou la nano avec différentes concentrations d'un anticorps monoclonal ciblant les résidus 47-62 d'ASP (Mab α -ASP, voir partie III2d du Matériel et Méthodes). Afin de prendre en considération la composition complexe du plasma et son impact éventuel sur l'interaction entre les anticorps et ASP, j'ai réalisé les dilutions du Mab α -ASP dans un mélange à volume équivalent du plasma de 4 donneurs séronégatifs (obtenus auprès de l'EFS). En présence de nano-ASP, j'ai obtenu un signal luminescent proportionnel à la concentration en Mab α -ASP (Figure 29A). En revanche, je n'ai obtenu aucun signal spécifique en réalisant le LIPS avec la nano seule. Dans l'ensemble, cette expérience test rapporte que le LIPS que j'ai développé permet la **détection spécifique et quantitative** d'anticorps dirigés contre ASP dans des conditions proches des conditions physiologiques.

Afin de déterminer le **seuil de positivité** indiquant la présence d'anticorps anti-ASP dans le plasma, j'ai ensuite évalué le **bruit de fond relatif à nano-ASP** dans le plasma de donneurs séronégatifs. Des variations dans la composition du plasma ayant été décrites entre différents groupes ethniques (Steffen et al. 2012), j'ai réalisé un LIPS sur le plasma d'individus séronégatifs de deux groupes ethniquement distincts: un groupe de 20 individus français et un groupe de 9 individus zambiens (Figure 29C). Les signaux moyens obtenus pour ces deux groupes étant peu différents, j'ai défini pour l'ensemble des patients de mon étude un seuil de positivité unique correspondant au signal luminescent moyen obtenu avec le groupe zambien additionné de trois écarts-types (**soit 51 000 RLU**). En choisissant un seuil de positivité élevé, j'ai privilégié la spécificité de la technique plutôt que sa sensibilité : les échantillons biologiques que je considère comme positifs pour la présence d'anticorps anti-ASP sont peu susceptibles d'être de faux positifs. En revanche, ce seuil de positivité élevé peut nous amener à considérer des échantillons faiblement positifs comme des échantillons négatifs.

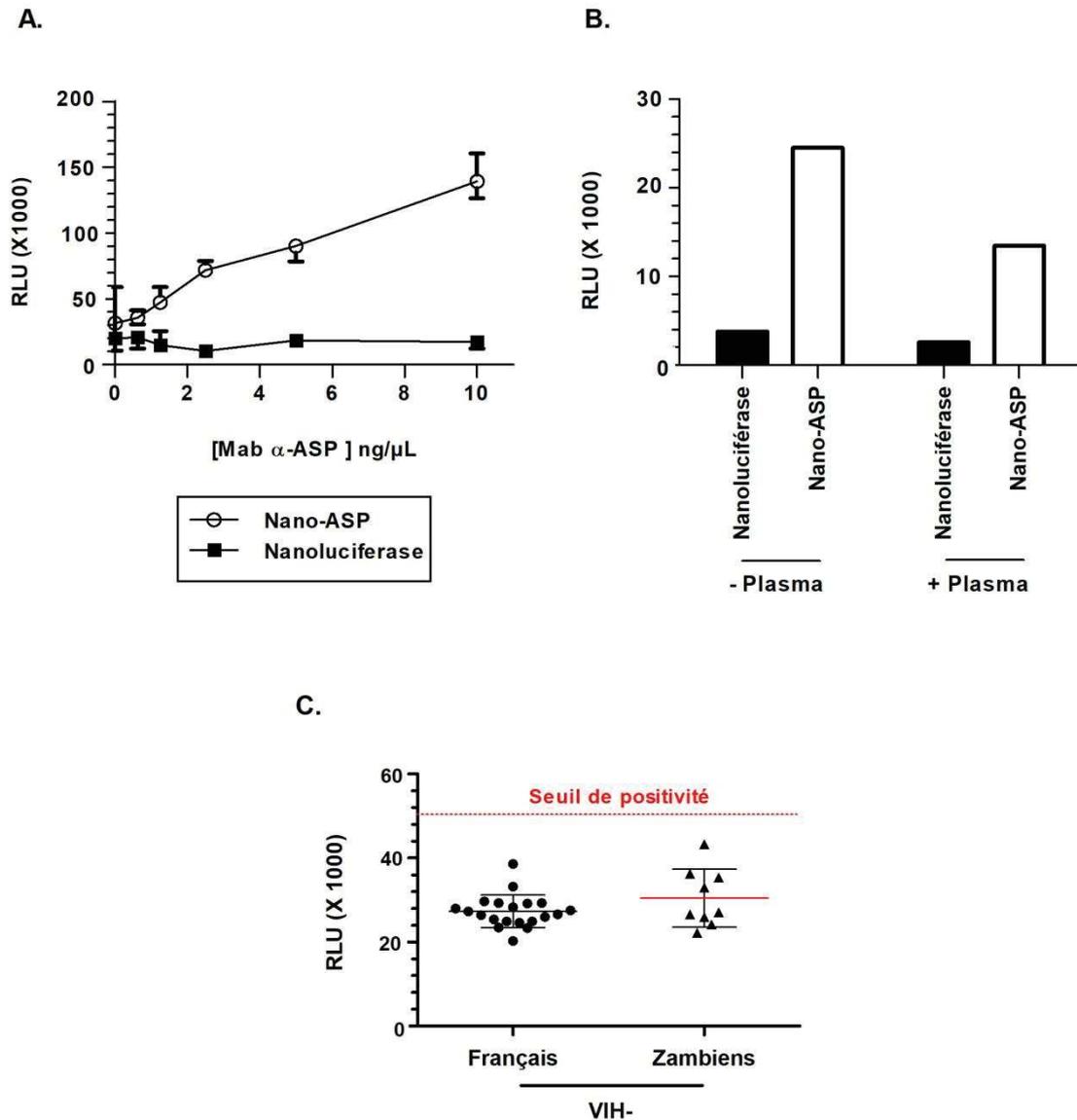


Figure 29 : Immuno-précipitation spécifique de nano-ASP par un anticorps monoclonal anti-ASP et détermination du bruit de fond associé à nano-ASP dans le plasma. **A.** Un LIPS a été réalisé à l'aide de différentes dilutions du Mab α -ASP, en utilisant soit nano-ASP, soit la nano. Les données représentent la valeur médiane d'une expérience réalisée en triplicats. **B.** Les bruit de fond relatifs à nano-ASP et à nano ont été évalués en réalisant un LIPS sur un mélange à volume équivalent du plasma de 4 donneurs séronégatifs français (+ plasma), ou en l'absence de plasma (- plasma). Les données représentent la moyenne de la valeur médiane de 3 expériences réalisées en triplicats. **C.** Détermination du seuil de positivité pour la présence d'anticorps anti-ASP dans le plasma par la réalisation d'un LIPS sur le plasma d'individus séronégatifs français (n=20) ou zambiens (n=9). Les barres indiquent la moyenne et les écarts-types de chaque groupe. Les données représentent la moyenne de la valeur médiane de 3 expériences réalisées en triplicats.

Le bruit de fond obtenu avec les deux groupes d'individus séronégatifs est conforme à celui obtenu avec la protéine de fusion *renilla*-HBZ (Enose-Akahata et al. 2013) et avec les protéines de fusion entre la *renilla* et différentes protéines du VIH-1 (Burbelo et al. 2014). En outre, le bruit de fond obtenu en utilisant la nano-ASP est supérieur à celui obtenu avec la nano (Figure 29B). Cette différence de bruit de fond est également observée lorsque le LIPS est réalisé en l'absence de plasma, ce qui suggère que le bruit de fond relatif à nano-ASP n'est pas uniquement dû à son interaction avec des composés plasmatiques, mais également à sa liaison aspécifique aux billes de sépharose utilisées dans le LIPS (Figure 29B).

2. Recherche d'anticorps anti-ASP dans les échantillons biologiques de patients infectés par le VIH-1

a. Détection d'anticorps anti-ASP dans le plasma et le lait maternel de patientes non traitées originaires du Burkina Faso

Après avoir testé le LIPS avec un Mab- α ASP et établi le seuil de positivité pour la présence d'anticorps anti-ASP, j'ai étudié la réponse anticorps anti-ASP dans le plasma de 19 patientes infectées par le VIH-1 et originaires du Burkina Faso (Table 1). Ces 19 patientes étaient des femmes allaitantes incluses dans la cohorte ANRS 12174 qui a été constituée dans le cadre de l'étude clinique PROMISE-PEP. Cette étude clinique visait à comparer l'efficacité de deux traitements prophylactiques des nouveau-nés dans la prévention de la transmission mère-enfant du VIH-1 via le lait maternel (Nagot et al. 2016).

Aucune des femmes incluses dans cette étude clinique n'étaient éligibles pour l'ART selon les recommandations nationales en vigueur lorsque la cohorte a été constituée en 2009 (leur taux de T CD4+ était supérieur à 350 cellules/ μ L de sang). Les patientes ont suivi les programmes nationaux de prévention de transmission du virus de la mère à l'enfant, qui comprenaient (i) la prise de zidovudine à partir de la 28^e semaine de grossesse jusqu'à la naissance, (ii) des doses uniques de nevirapine au cours de l'accouchement et (iii) une combinaison de zidovudine et de lamivudine pendant les 7 jours suivant la naissance de l'enfant (Figure 30) (Nagot et al. 2016). La prise d'agents rétroviraux (ARV) a été arrêtée 7 jours post-partum. Dans le cadre de l'étude PROMISE-PEP, un suivi clinique des patientes a été réalisé régulièrement au cours de l'allaitement, de 7 jours à 50 semaines post-partum. **Pour la suite,**

je définirai l'échelle de temps du suivi longitudinal des patientes relativement à l'arrêt de la prise d'ARV, soit 7 jours après l'accouchement (Figure 30).

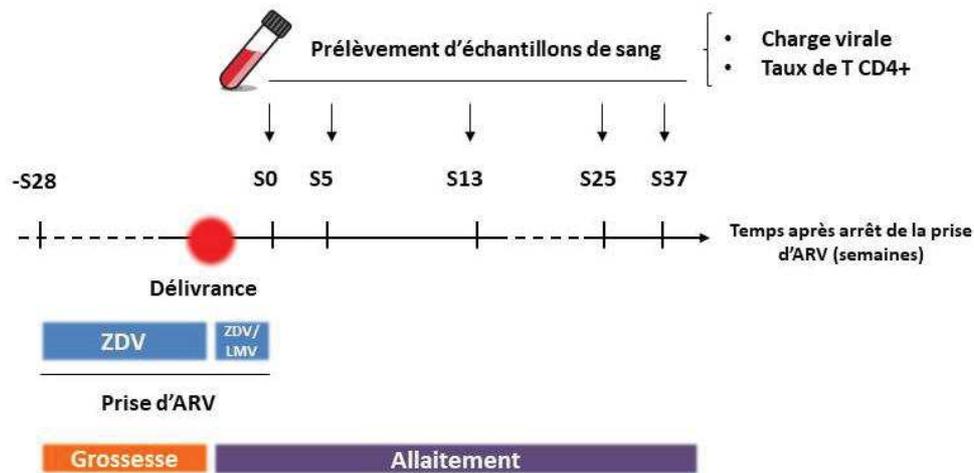


Figure 30 : Protocole de la prise d'ARV et suivi des patientes incluses dans l'étude clinique PROMISE-PEP (Nagot et al. 2016). Les femmes de la cohorte ANRS 12174 ont reçu des ARV à des fins prophylactiques : de la zidovudine (ZDV) au cours de leur grossesse, puis une combinaison de zidovudine et de lamivudine (LMV) pendant 7 jours post-partum. Un suivi clinique des femmes a été réalisé de 7 jours après délivrance (arrêt de la prise d'ARV ; S0) à 38 semaines après délivrance (37 semaines après arrêt de la prise d'ARV ; S37). La charge virale plasmatique et le taux de T CD4⁺ ont été évalués à des temps intermédiaires.

Les 19 patientes ont reçu des ARV pendant 4 à 16 semaines (Table 1). Lors des examens cliniques réalisés dans le cadre de l'étude clinique PROMISE-PEP, leur charge virale plasmatique (CV) et leur taux de T CD4⁺ ont été déterminés. Nous avons sélectionné ces 19 patientes pour notre étude car elles présentaient deux types de profil suite à l'arrêt de la prise d'ARV (S0) (Table 2) : une **CV indétectable** (patientes #11 à #19 ; **groupe IND**) indiquant une bonne efficacité des ARV, et une **CV détectable** (patientes #1 à #10 ; **groupe DET**), d'une valeur moyenne de 30 298 copies d'ARN viral/mL à S0, indiquant une faible efficacité des ARV.

Après 37 ou 41 semaines (S37/41; Table 1) d'arrêt de la prise d'ARV, les deux groupes de patientes présentaient une CV détectable (Table 2). Entre S0 et S37/41, la CV des patientes du groupe DET a en moyenne été multipliée par un facteur 24, et la CV des patientes du groupe IND par un facteur 1450 (Table 2). Le rebond viral a donc été plus important pour les patients qui présentaient une CV indétectable à S0.

Patient	Durée de la prise d'ARV (semaines)	Nombre de semaines après arrêt de la prise d'ARV	Charge virale (copies d'ARN /mL de sang)	Nombre de T CD4+/ μ L de sang
P#1	11	0	14770	ND
		37	1146000	403
P#2	16	0	14920	ND
		37	609800	536
P#3	11	0	20320	ND
		37	ND	ND
P#4	14	0	21740	ND
		37	438900	522
P#5	10	0	97030	ND
		37	ND	ND
P#6	8	0	16090	ND
		37	338600	395
P#7	7	0	17280	ND
		37	ND	ND
P#8	6	0	20220	ND
		37	92330	468
P#9	7	0	50320	ND
		37	ND	ND
P#10	13	0	96160	ND
		37	ND	ND
P#11	5	0	Indétectable	ND
		25	ND	ND
P#12	0	0	Indétectable	ND
		37	1712	728
P#13	13	0	Indétectable	ND
		37	9069	ND
P#14	8	0	Indétectable	ND
		37	318700	729
P#15	14	0	Indétectable	ND
		37	250400	545
P#16	4	0	Indétectable	ND
		37	3931	831
P#17	11	0	Indétectable	ND
		37	17210	847
P#18	6	0	Indétectable	ND
		37	1128000	372
P#19	2	0	Indétectable	ND
		37	ND	ND

Table 1 : Description des paramètres immuno-virologiques des 19 patientes originaires du Burkina-Faso de la cohorte ANRS 12174 à S0 et à S37. ND : Données non disponibles.

Les valeurs du taux de T CD4+ des 19 patientes n'étaient pas disponibles à S0. A S14, le taux moyen de T CD4+ était respectivement de 662 cellules/ μ L pour le groupe IND et de 567

cellules/ μ L pour le groupe DET (Table 2). Entre S14 et S37, le taux moyen de T CD4+ a diminué dans les deux groupes de patientes, avec un déclin plus marqué pour le groupe DET que pour le groupe IND (Table 2).

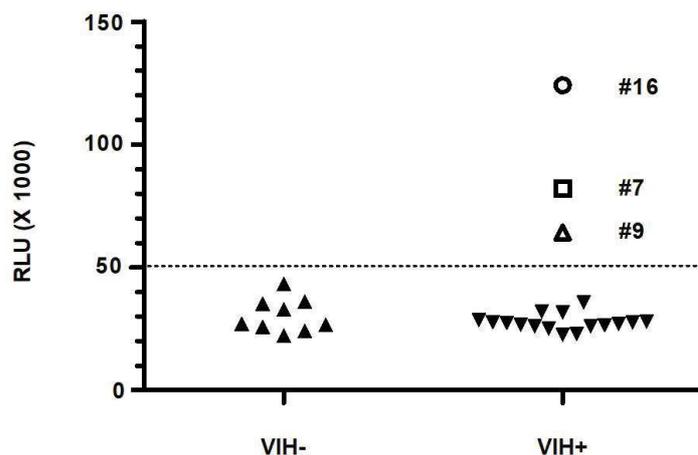
Dans l'ensemble, la prise d'ARV au cours de la grossesse a permis le contrôle de la réplication virale chez les patientes du groupe IND. Pour les deux groupes, l'arrêt de la prise d'ARV s'est accompagné d'une légère chute du taux de T CD4+ et d'un rebond viral, modeste pour le groupe DET, et marqué pour le groupe IND.

		Groupe DET	Groupe IND
Patients		Pat #1 à 10	Pat #11 à 19
CV moyenne (copies d'ARN viral/mL)	S0	3.10^4	ND
	S37/41	$6,5.10^5$	$2,5.10^5$
Rebond viral moyen entre S0 et S37/41		24	1450
Taux de T CD4+ moyen /μL	S14	567	662
	S37/41	465	579

Table 2 : Caractéristiques Immuno-virologiques des groupes de patientes du Burkina Faso dont la charge virale était détectable (groupe DET) ou indétectable (groupe IND) à l'arrêt de la prise d'ARV. CV : Charge virale.

Recherche d'anticorps anti-ASP dans le plasma des patientes #1 à #19

J'ai commencé par rechercher la présence d'anticorps dirigés contre ASP dans le plasma des 19 patientes à S37. En réalisant 3 expériences de LIPS, j'ai obtenu un signal luminescent moyen de 37 390 RLU pour l'ensemble des patientes (Figure 31). La composition du plasma subissant des modifications au cours de la grossesse (Amino et al. 1978; Joseph et al. 1978; Soma-Pillay et al. 2016), il est intéressant de noter que le groupe zambien à partir duquel j'ai défini le seuil de positivité à 51 000 RLU (Figure 29C) étaient des patientes séronégatives allaitantes, et constituaient donc un groupe contrôle particulièrement adapté à la recherche d'anticorps anti-ASP dans le plasma des patientes allaitantes du Burkina Faso.



(Reiss et al. 1990; O'Neil et al. 1997; Rezza et al. 2005) et contre la protéine HBZ de HTLV-1 (Enose-Akahata et al. 2013; Shiohama et al. 2016).

Détermination du titre d'anticorps anti-ASP dans le plasma des patientes #7, #9 et #16

L'intensité du signal obtenu par LIPS résulte de deux paramètres principaux : la **concentration** en anticorps anti-ASP dans le plasma et l'**avidité** des anticorps pour ASP. L'avidité des anticorps *in vivo* découle principalement de leur **affinité** pour l'antigène et de leur **valence**. *In vivo*, la réponse anticorps élicitée contre un antigène est presque toujours polyclonale, et son avidité dépend **(i)** de l'**isotype** des anticorps impliqués dans la réponse polyclonale, **(ii)** de leur proportion relative et **(iii)** de leur affinité pour ASP. La contribution de ces différents paramètres au signal détecté par le LIPS est inconnue. Contrairement au Mab- α ASP, la concentration en anticorps anti-ASP dans le plasma ne peut donc pas être déterminée. En revanche, le **titre d'anticorps anti-ASP**, défini comme la dilution plasmatique à laquelle le signal détecté chute en-dessous du seuil de positivité (51 000 RLU), peut être déterminé pour chaque patiente.

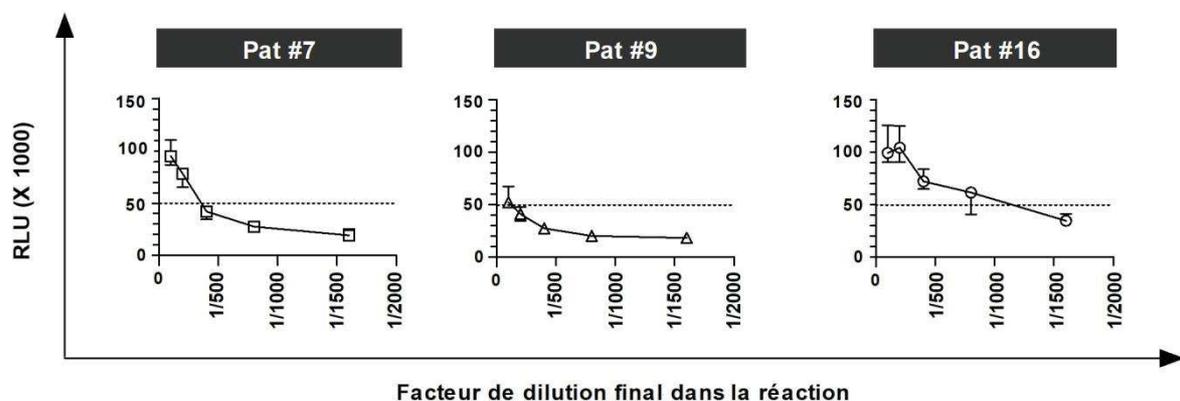


Figure 32: Détermination du titre d'anticorps anti-ASP dans le plasma des patientes #7, #9 et #16 à S37. Des dilutions plasmatiques ont été réalisées du 1/100^e (dilution utilisée dans le LIPS) au 1/1600^e. Les données représentent la valeur médiane d'une expérience réalisée en triplicats. La ligne en pointillé représente le seuil de positivité (51 000 RLU).

Le titre d'anticorps anti-ASP a été déterminé à S37 pour les patientes #7, #9 et #16 en réalisant des dilutions plasmatiques successives, du 1/100^e (dilution utilisée Figure 31) au 1/1600^e. Pour les patientes #7 et #9, le signal chute sous le seuil de détection aux dilutions

respectives 1/400 et 1/200, tandis qu'il reste positif jusqu'à la dilution 1/800 pour la patiente #16 (Figure 32). En outre, l'intensité du signal de la patiente #16 ne diminue pas à la dilution 1/200, ce qui suggère que le nombre d'anticorps capables de lier ASP dans son plasma excédait le nombre d'antigènes disponibles à la dilution 1/100^e utilisée Figure 31.

Dans l'ensemble, cette expérience confirme les résultats présentés Figure 31 et indique que parmi les 3 patientes qui présentent des anticorps anti-ASP, la patiente #16 est celle qui présente le plus fort titre d'anticorps anti-ASP à S37. Ce titre plus important peut indiquer une plus forte concentration en anticorps anti-ASP, une meilleure affinité de ses anticorps pour ASP ou encore la plus grande diversité d'épitopes d'ASP ciblés par sa réponse anticorps.

Recherche d'anticorps anti-ASP dans le lactosérum des patientes #7, #9 et #16

Lors du suivi des patientes de l'étude clinique PROMISE-PEP (Figure 30), leur lait maternel a également été prélevé à différents temps après arrêt de la prise d'ARV (Nagot et al. 2016). Les patientes #7, #9 et #16 présentant des anticorps anti-ASP dans leur plasma, j'ai également recherché la présence d'anticorps anti-ASP dans leur lactosérum à deux points temporels disponibles (S0 et S37). Comme je ne disposais pas d'échantillons de lait maternel de patientes séronégatives, je n'ai pas déterminé de seuil de positivité spécifique au lactosérum, et j'ai conservé celui déterminé pour le plasma (51 000 RLU). Cependant, j'ai également effectué un LIPS sur le lactosérum de la patiente #1 qui ne présentait pas d'anticorps anti-ASP dans son plasma à S37 (Figure 31), afin d'évaluer le bruit de fond de la nano-ASP dans le lactosérum.

Dans des conditions physiologiques non inflammatoires, les IgA constituent l'isotype majoritaire du lait maternel, suivies des IgM et des IgG (Van de Perre 2003; Wheeler et al. 2007). Malgré cette prévalence, les IgG dominent les réponse anticorps anti-Gag, -Pol et -Env dans le lait maternel des individus infectés par le VIH-1 (Van de Perre et al. 1988, 1993; Fouda et al. 2011; Mabuka et al. 2012). J'ai détecté les anticorps anti-ASP dans le plasma des patientes #7, #9 et #16 en utilisant des protéines A/G qui lient fortement le fragment Fc des IgG, mais faiblement celui des IgA et des IgM (Figure 31 ; Figure 32). Bien que ces résultats n'excluent pas une contribution mineure des IgA et des IgM au signal détecté dans le plasma, les anticorps plasmatiques anti-ASP sont probablement des IgG.

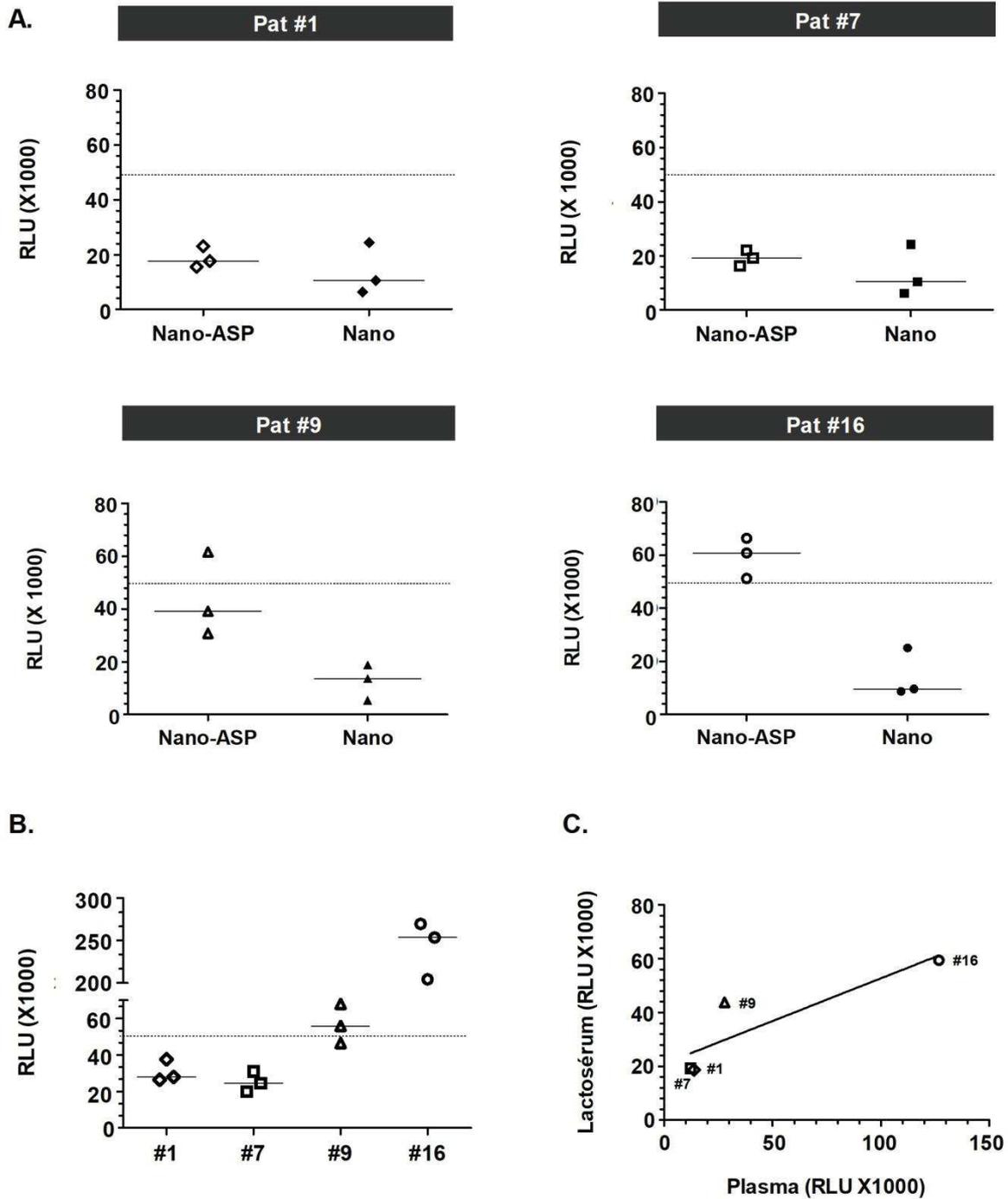


Figure 33 : Recherche d'anticorps anti-ASP dans le lactosérums et le plasma des patientes #1, #7, #9 et #16 à S0. A et B. Chaque point représente la moyenne des valeurs médianes de 3 expériences réalisées en triplicats. La barre représente la moyenne des 3 points représentés et la ligne en pointillé représente le seuil de positivité (51 000 RLU). **A.** Un LIPS a été réalisé en utilisant nano-ASP ou nano sur le lactosérums des patientes #1, #7, #9 et #16 à S0. **B.** Recherche d'anticorps anti-ASP dans le plasma des patientes #1, #7, #9 et #16 à S0. **C.** Représentation sous forme d'un diagramme de dispersion des signaux obtenus à S0 dans le lactosérums et le plasma pour les patientes #1, #7, #9 et #16.

Contrairement aux IgA qui sont produites localement au niveau de la glande mammaire, les IgG du lait maternel proviennent du transfert d'IgG plasmatiques à travers la barrière épithéliale mammaire (Figure 18) (Wheeler et al. 2007; Fouda et al. 2011; Van de Perre et al. 2012). Du fait de l'origine humorale des IgG du lait maternel et de l'importante contribution de cet isotype aux réponses anti-VIH-1 dans le lait maternel, j'ai recherché la présence d'anticorps anti-ASP dans le lactosérum des patientes #7, #9 et #16 en utilisant des billes recouvertes de protéines A/G.

Pour les 4 patientes à S0, le signal obtenu avec le contrôle nano seul était d'environ 10 000 RLU, et le signal obtenu avec la nano-ASP dans le lactosérum de la patiente #1 était d'environ 18 000 RLU (Figure 33A). Ce résultat suggère que le bruit de fond de la nano-ASP dans le lactosérum est d'environ 18 000 RLU, soit légèrement inférieur à celui observé dans le plasma (Figure 29B et C). A S0, la patiente #7 présentait un signal similaire à celui de la patiente #1, ce qui suggère que cette patiente ne possédait pas d'IgG anti-ASP dans son lactosérum à S0 (Figure 33A). La patiente #16 présentait un signal légèrement supérieur au seuil de positivité dans son lactosérum (Figure 33A), indiquant la présence probable d'IgG anti-ASP. La patiente #9 présentait dans son lactosérum un signal légèrement inférieur au seuil de positivité (51 000 RLU), mais supérieur au bruit de fond (18 000 RLU), ce qui suggère que son lait maternel présentait également des IgG anti-ASP à S0 (Figure 33A).

J'ai également analysé la présence d'anticorps anti-ASP dans le plasma des patientes #1, #7, #9 et #16 à S0 (Figure 33B). Les patientes #9 et #16 présentaient des anticorps anti-ASP dans leur plasma comme dans leur lait maternel à S0. A l'inverse, les patientes #1 et #7 ne présentaient d'anticorps anti-ASP ni dans leur plasma ni dans leur lait maternel à S0 (Figure 33B). L'intensité du signal détecté dans le lactosérum des patientes semble donc être positivement liée à celle du signal détecté dans leur plasma à S0 (Figure 33C). Ces résultats suggèrent qu'au moins une partie des anticorps anti-ASP du lait maternel est originaire du plasma, et sont en accord avec une précédente étude qui a rapporté une corrélation entre la concentration des anticorps anti-Env dans le plasma et le lait maternel (Fouda et al. 2011).

J'ai ensuite analysé la réponse anticorps anti-ASP dans le lactosérum des patientes #7, #9 et #16 à S37, puis j'ai comparé le signal à celui précédemment obtenu dans le plasma de ces patientes à S37 (Figure 31 ; Figure 32). Le lactosérum de la patiente #1 à S37 n'était pas disponible. A S37, les patientes #7, #9 et #16 présentaient un signal inférieur au seuil de positivité dans leur lactosérum, mais un signal positif dans leur plasma (Figure 34A et B). Entre

S0 et S37, le signal a diminué dans le lactosérum et le plasma de la patiente #16 (Figure 34A). Pour la patiente #9, le signal a augmenté dans son plasma, mais diminué dans son lait maternel. Le signal de la patiente #7 a augmenté dans son plasma entre S0 et S37, mais cela ne s'est pas traduit par une augmentation du signal dans son lactosérum. Malgré les disparités de la fluctuation des signaux dans le plasma et le lait maternel, le signal détecté dans le lactosérum à S37 semble être positivement associé à celui détecté dans le plasma, comme cela avait été observé à S0 (Figure 34C).

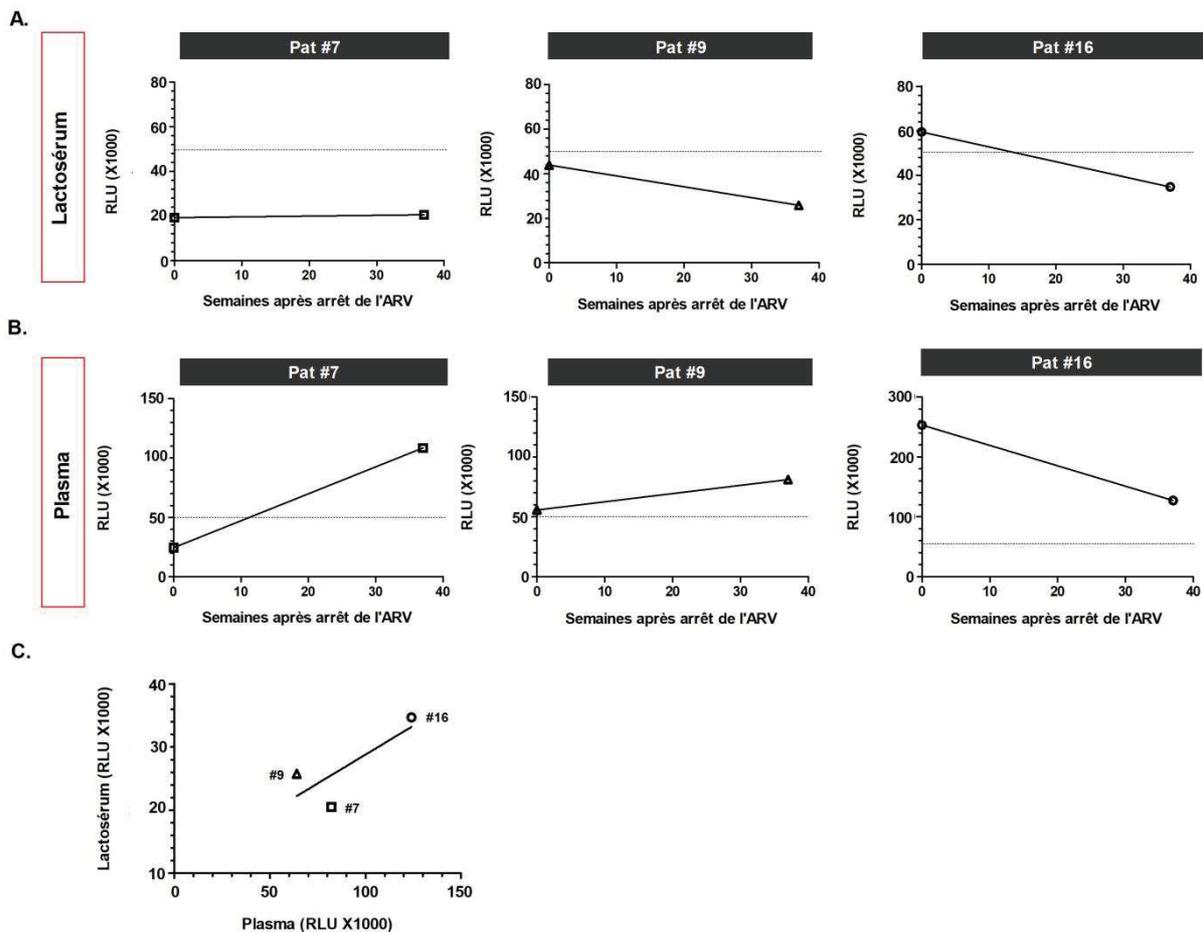


Figure 34 : Recherche d'anticorps anti-ASP dans le lactosérum et le plasma des patientes #7, #9 et #16 à S37. A et B Fluctuation des signaux obtenus par LIPS entre S0 et S37 dans le lactosérum (A) et le plasma (B) des patientes #7, #9 et #16. A S0 et à S37, les données représentent la moyenne des valeurs médianes de 3 expériences réalisées en triplicats. La ligne en pointillé représente le seuil de positivité (51 000 RLU). C. Représentation sous forme d'un diagramme de dispersion des signaux obtenus à S37 dans le lactosérum et le plasma pour les patientes #7, #9 et #16.

La diminution du signal dans le lait maternel de la patiente #9 entre S0 et S37 pourrait indiquer un changement dans la prévalence isotypique de la réponse anticorps anti-ASP du lait

maternel, ou une diminution du transfert des IgG du plasma au lait maternel. Par ailleurs, les concentrations totales en IgA, IgG et IgM du lait précoce sont supérieures d'environ un log à celles retrouvées dans le lait maternel mature (Wheeler et al. 2007). Il est donc possible qu'à S37, la concentration totale en anticorps du lactosérum soit inférieure à celle retrouvée à S0 (soit 7 jours après l'accouchement).

Ces résultats constituent le premier rapport de la présence potentielle d'anticorps anti-ASP dans le lait maternel de patientes infectées par le VIH-1. Pour les patientes #7, #9 et #16, la variation du signal du lait maternel ne reflète pas toujours celle du plasma. Il est donc possible que les anticorps anti-ASP plasmatiques ne soient pas l'unique source des anticorps anti-ASP retrouvés le lait maternel. Ces résultats ont été obtenus en utilisant des billes recouvertes de protéines A/G et ne prennent donc pas en considération les éventuelles réponses IgA et IgM anti-ASP du lait maternel. Le développement d'un système LIPS basé sur l'utilisation de protéines L qui lient également les IgA et les IgM est en cours.

b. Recherche d'anticorps anti-ASP dans le plasma de patients français sous ART

Après avoir détecté des anticorps anti-ASP dans le plasma de 3 patientes non traitées, j'ai recherché la présence d'anticorps anti-ASP dans le plasma de 20 patients français sous ART, en consultation au CHU de Montpellier (Patients #20 à #39). Les échantillons de sang à partir desquels j'ai isolé le plasma ont été obtenus de prélèvements effectués lors du suivi clinique des patients. Les 20 patients présentaient une CV indétectable à la date du prélèvement.

En effectuant un LIPS sur le plasma de ces 20 patients, j'ai obtenu une luminescence moyenne similaire au bruit de fond observé pour le groupe d'individus séronégatifs français (Figure 35 ; Figure 29C). Deux des patients sous ART présentaient un signal légèrement supérieur au signal moyen de l'ensemble du groupe (patients #28 et #38) (Figure 35), mais ces signaux restaient sous le seuil de positivité (51 000 RLU). Il n'est donc pas à exclure que les patients #28 et #38 présentent un faible titre d'anticorps anti-ASP, mais que la sensibilité de ma technique ne permette pas de discerner ce signal du bruit de fond. Il serait donc intéressant d'analyser de nouveau la réponse anticorps anti-ASP chez ces deux patients après avoir

amélioré la sensibilité du LIPS, par exemple en utilisant comme antigène un mutant d'ASP qui permet de diminuer le bruit de fond.

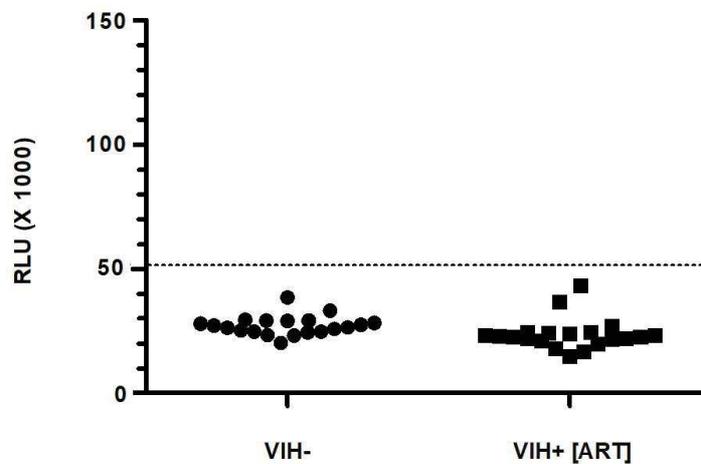


Figure 35 : Les patients sous ART ne présentent pas d'anticorps anti-ASP. Résultats du LIPS réalisé sur le plasma des patients sous ART (VIH +). Les valeurs obtenues du LIPS réalisé sur le plasma des patients séronégatifs français (VIH-) (Figure 29C) sont également représentées. Les données représentent la moyenne de la valeur médiane de 3 expériences réalisées en triplicats. La ligne en pointillé représente le seuil de positivité (51 000 RLU).

Enfin, étant donné la faible fréquence des patientes du Burkina Faso qui présentent des anticorps anti-ASP (15 %), il est possible que l'absence de signal observé chez les patients sous ART soit due au faible nombre de patients analysés. Cependant, l'absence de détection d'anticorps anti-ASP parmi les patients sous ART étudiés est en accord avec de précédentes études qui ont rapporté un important déclin des réponses anticorps dirigées contre les protéines Gag, Pol et Env du VIH-1 suite à l'initiation de l'ART (Voltersvik et al. 2003; Killian et al. 2006; Zhang et al. 2017; Delagreverie et al. 2019). Mes résultats suggèrent que le contexte immuno-virologique des patients sous ART n'est pas favorable à l'élaboration ou au maintien de la réponse anticorps anti-ASP. Il n'est donc pas à exclure que les patients sous ART aient présenté des anticorps anti-ASP avant l'initiation de l'ART.

Il est possible que les changements immuno-virologiques induits par l'ART impactent l'établissement ou le maintien de la réponse anticorps anti-ASP. Plus particulièrement, mes résultats interrogent sur l'existence d'un lien entre la CV indétectable des patients sous ART et l'absence d'anticorps anti-ASP.

c. Recherche d'anticorps anti-ASP dans le plasma de patients progressseurs et naïfs de tout traitement

L'absence d'anticorps anti-ASP chez les patients avirémiques sous ART (Figure 35) interroge sur la nature d'un lien éventuel entre la réplication virale et la réponse anticorps anti-ASP. Afin de progresser dans notre compréhension de ce lien potentiel, j'ai analysé la présence d'anticorps anti-ASP dans le plasma de 10 patients français inclus dans la cohorte ANRS SEROCO (patients #40 à #49) avant (pré-ART) et après (post-ART) initiation de l'ART. La cohorte SEROCO a été constituée en 1988 afin d'analyser les paramètres immuno-virologiques associés à l'évolution naturelle de l'infection par le VIH-1, qui étaient alors peu connus (Hubert et al. 2000). Le principe de la trithérapie a été introduit en 1996 (Collier et al. 1996; D'Aquila et al. 1996; Staszewski et al. 1996). Aucun des patients de cette cohorte n'a donc reçu de trithérapie avant 1996, mais certains patients ont reçu une mono- ou une bithérapie entre 1991 et 1996. Cependant, ces traitements n'ont eu qu'une efficacité limitée sur le contrôle de la réplication virale (données non présentées). **Pour la suite, j'ai défini la date d'initiation de l'ART comme la date à laquelle chaque patient a reçu sa première thérapie antirétrovirale, qu'il s'agisse d'une mono-, d'une bi- ou d'une trithérapie.** Pour tous les patients, plusieurs combinaisons d'ART ont été testées au cours de leur suivi clinique.

Lors du suivi de ces patients, la CV plasmatique et le taux de T CD4+ ont été analysés. Nous avons sélectionné ces 10 patients pour leurs profils d'évolution du taux de T CD4+ diversifiés après initiation de l'ART, ce qui reflétait potentiellement des différences dans l'efficacité de leur traitement (Table 3). Les patients #41, #44, #45 et #46 présentaient un taux de T CD4+ en augmentation constante post-ART, suggérant l'efficacité au moins partielle de l'ART. Pour les patients #40 et #42, le taux de T CD4+ a progressivement décliné au cours du temps malgré l'initiation de l'ART. Lors de leur dernier suivi clinique, leur taux de T CD4+ était en deçà de 200 cellules/ μ L. De nombreuses combinaisons d'ARV ont été administrées à ces deux patients, mais aucune n'a permis de restaurer leur taux de T CD4+. Chez les patients #43, #47, #48 et #49, le taux de T CD4+ a fortement fluctué au cours du temps après initiation de l'ART, atteignant un minimum de 255 cellules/ μ L pour le patient #43 et un maximum de 1207 cellules/ μ L de l'ART pour le patient #48.

Patient	Origine géographique	Années post-inclusion	ART	Nombre de T CD4+/ μ L de sang
Pat#40	Europe (France)	2,5	NT	690
		13,5	AZT ^a -DDC ^b -InR ^c	58
Pat#41	Europe (France)	3	NT	413
		15	3TC ^d -ABC ^e -NVP ^f	572
Pat#42	Europe (France)	2,5	NT	805
		8,5	3TC-AZT-IDV ^g	171
Pat#43	Europe (France)	3,5	NT	514
		15	AZT-DDI ^h	558
Pat#44	Europe (France)	2,5	NT	720
		10,75	AZT-DDC-SQV ⁱ	768
Pat#45	Europe (France)	1,5	NT	791
		14,5	ABC-DDI-EFV ^j	649
Pat#46	Europe (France)	2,5	NT	600
		12,5	D4T-NVP-SqR ^k	1087
Pat#47	Europe (France)	5	NT	350
		13	3TC-ABC-AZT	776
Pat#48	Europe (France)	4,5	NT	785
		12	3TC-D4T ^l	681
Pat#49	Europe (France)	4,5	NT	500
		13	3TC-D4T	652

Table 3 : Description des paramètres immuno-virologiques des 10 patients de la cohorte ANRS SEROCO aux deux temps post-inclusion étudiés (pré-ART et post-ART). a Azidothymidine ; b Dideoxycytidine ; c Lopinavir ; d Lamivudine ; e Abacavir ; f Nevirapine ; g Indinavir ; h Didanosine ; i Saquinavir ; j Efavirenz ; k Saquinavir ; l Stavudine. ND : Données non disponible.

Les patients de la cohorte SEROCO ont été inclus au plus tard 12 mois après leur infection (Hubert et al. 2000). Bien que leur date d'infection exacte soit inconnue, les 10 patients sélectionnés présentaient un taux de T CD4+ supérieur à 1000 cellules/ μ L lorsqu'ils ont été inclus dans la cohorte (données non présentées), suggérant leur inclusion à un stade très précoce de l'infection. Pour la suite, je définirai l'échelle de temps du suivi des patients relativement à trois événements :

- **A leur inclusion dans la cohorte.** Je préciserai (i) le nombre d'années post-inclusion à la date considérée (Table 3) et (ii) si les échantillons post-inclusion ont été prélevés avant (pré-ART) ou après (post-ART) initiation de l'ART.
- **A l'initiation de l'ART.** Le cas échéant, je préciserai le nombre d'années post-ART à la date considérée.

- A leur date d'infection présumée, soit au plus tard un an avant leur inclusion.

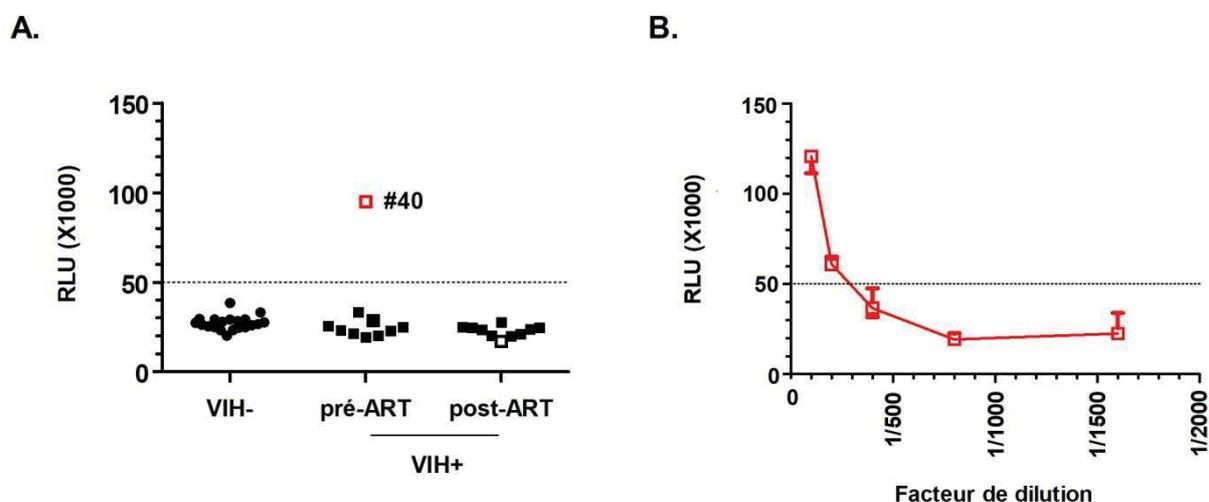


Figure 36 : Un des 10 patients de la cohorte SEROCO présente des anticorps anti-ASP plasmatiques avant initiation de l'ART. A. Résultats du LIPS réalisé sur le plasma des patients de la cohorte SEROCO (VIH +) avant (pré-ART) et après (post-ART) initiation de l'ART. Le patient #40 est identifié par un le même symbole pré-ART (en rouge) et post-ART (en noir). Les valeurs obtenues du LIPS réalisé sur le plasma des patients séronégatifs français (VIH-) (Figure 29C) sont également représentées. Les données représentent la moyenne de la valeur médiane de 3 expériences réalisées en triplicats. La ligne en pointillé représente le seuil de positivité (51 000 RLU). **B.** Le titre d'anticorps anti-ASP du plasma obtenu du patient #40 après 2.5 années d'inclusion dans la cohorte (pré-ART) a été déterminé en réalisant des dilutions plasmatiques du 1/100e (dilution utilisée en A.) au 1/1600e. Les données représentent la valeur médiane d'une expérience réalisée en triplicats.

J'ai commencé par analyser la présence d'anticorps anti-ASP dans le plasma des 10 patients avant l'initiation de l'ART (pré-ART). Au point pré-ART auquel j'ai recherché les anticorps anti-ASP, les patients étaient inclus dans la cohorte depuis 1.5 à 4.5 années (Table 3), soit au plus tard 2.5 à 5.5 années après leur date d'infection présumée. Pré-ART, le signal moyen obtenu pour l'ensemble des patients était similaire au bruit de fond précédemment décrit (Figure 36A ; Figure 29C). Seul un des 10 patients (patient #40) présentait un signal supérieur au seuil de positivité (Figure 36A). L'échantillon de plasma de ce patient a été obtenu 2.5 années après son inclusion dans la cohorte, ce qui indique qu'il présentait des anticorps anti-ASP au plus tard 3.5 années après sa date d'infection supposée (Table 3). La fréquence de patients positifs pour la présence d'anticorps anti-ASP pré-ART était de 10% (1 sur 10), ce qui diffère peu de la fréquence observée parmi les patientes du Burkina Faso (15% ; Figure 31).

Post-ART, aucun des 10 patients ne présentait de signal supérieur au seuil de positivité (Figure 36A). En particulier, le patient #40 ne présentait plus de signal positif après 8 années d'ART (Figure 36A), soit 11 années après la détection d'anticorps anti-ASP chez ce patient (Table 3). Cela suggère que la réponse anticorps anti-ASP a disparu au cours du temps chez le patient #40, potentiellement suite à l'initiation de l'ART. Ce résultat interroge donc encore une fois sur un lien éventuel entre la réplication virale et la réponse anticorps anti-ASP. L'évolution de la CV du patient #40 au cours du suivi clinique sera présentée dans la **partie I3b des résultats**.

J'ai ensuite déterminé le titre d'anticorps anti-ASP dans l'échantillon de plasma positif du patient #40, en réalisant des dilutions plasmatiques successives du 1/100^e au 1/1600^e. Le signal chute sous le seuil de détection lorsque le plasma est dilué au 1/400, comme précédemment observé pour la patiente #7 (Figure 32; Figure 36B). Ce résultat suggère que le titre d'anticorps du patient #40 est similaire à celui de la patiente #7, mais inférieur à celui de la patiente #16 (Figure 32).

Dans l'ensemble, **(i)** la détection d'anticorps anti-ASP dans le plasma de 1 des 10 patients pré-ART et **(ii)** la disparition de cette réponse anticorps après 8 années d'ART chez le patient #40 sont en accord d'une part avec la fréquence de patientes positives du Burkina Faso (15%), et d'autre part avec l'absence d'anticorps anti-ASP chez les patients sous ART. La disparition des anticorps anti-ASP post-ART chez le patient #40 suggère encore une fois que le contexte immuno-virologique induit par l'ART n'est pas favorable au maintien de la réponse anticorps anti-ASP, et interroge sur un lien éventuel entre la réplication virale et la réponse anticorps anti-ASP *in vivo*.

d. Recherche d'anticorps anti-ASP dans le plasma de patients qui contrôlent spontanément la réplication virale

Les profils des patients sous ART et du patient #40 interrogent sur la nature du lien éventuel entre les profils immuno-virologiques (et en particulier la CV) des patients et la réponse anticorps anti-ASP. Afin d'étudier ce lien plus avant, j'ai recherché la présence d'anticorps anti-ASP dans le plasma de 20 patients présentant un contrôle spontané de la réplication virale en

l'absence de tout traitement (Patients *controllers* #50 à #69 ; Table 4). Ces 20 patients étaient inclus dans la cohorte ANRS CODEX constituée en 2009 dans le but d'analyser les paramètres immuno-virologiques associés à la non-progression de l'infection (Lambotte et al. 2005; Sáez-Ciri3n et al. 2007a).

A l'inclusion, les 20 patients 3taient na3fs de tout traitement, s3ropositifs pour le VIH-1 depuis au moins 5 ans et pr3sentaient une CV inf3rieure 3 400 copies d'ARN viral/mL (Table 4) (Lambotte et al. 2005). Le taux de T CD4⁺ et la CV plasmatique des patients ont 3t3 3valu3s au cours de leur suivi clinique post-inclusion. Parmi les 20 patients 3tudi3s, 18 3taient d'origine Europ3enne, et 2 3taient d'origine Maghr3bine (Table 4). Les profils des patients #7, #16 et #40 entre S0 et S37 ont au pr3alable sugg3r3 une dynamique de la r3ponse anticorps anti-ASP au cours du temps (Figure 34B ; Figure 36A). J'ai donc recherch3 la pr3sence d'anticorps anti-ASP dans le plasma des 20 patients *controllers* 3 deux diff3rents temps post-inclusion (Table 4 ; Figure 37).

Aux deux points post-inclusion analys3s, le signal moyen de l'ensemble des 20 patients *controllers* 3tait en-dessous du seuil de positivit3 et similaire au bruit de fond obtenu pr3c3demment (Figure 37 ; Figure 29C). Un des 20 patients pr3sentait un signal l3g3rement sup3rieur 3 celui du reste du groupe (patient #53 ; Figure 37), mais la sensibilit3 du LIPS ne permettait pas de discerner ce signal du bruit de fond. Dans l'ensemble, ces r3sultats sugg3rent qu'aucun des 20 patient *controllers* 3tudi3s ne pr3sentait d'anticorps anti-ASP aux 2 points post-inclusion analys3s.

Dans l'ensemble, l'absence d'anticorps anti-ASP chez les patients *controllers* sugg3re que leur contexte immuno-virologique n'3tait pas favorable 3 l'3tablissement ou au maintien de la r3ponse anticorps anti-ASP, ce qui est en faveur d'une association positive entre la r3plication virale et la r3ponse anticorps anti-ASP.

Patient	Origine géographique	Années post-inclusion	Charge virale (copies d'ARN /mL de sang)	Nombre de T CD4+/ μ L de sang
Pat#50	Europe	1	<20	1238
		3	<20	1917
Pat#51	Europe	0	<50	809
		2	<40	874
Pat#52	Europe	0	<10	790
		2	<10	1153
Pat#53	Afrique (Maghreb)	4	<40	1216
		6	<40	1320
Pat#54	Europe	2	41	478
		4	<40	554
Pat#55	Europe	3	<40	644
		5	42	539
Pat#56	Europe	1	<20	676
		3	<20	628
Pat#57	Europe	3	<40	452
		6	<40	630
Pat#58	Europe	0	<20	627
		2	<20	662
Pat#59	Europe	0	<40	1224
		2	<40	1482
Pat#60	Afrique (Maghreb)	0	<40	421
		2	<40	666
Pat#61	Europe	1	<20	712
		3	23	979
Pat#62	Europe	2	<20	1382
		4	<20	1509
Pat#63	Europe	2	<40	966
		4	<40	851
Pat#64	Europe	1	<40	570
		3	<30	600
Pat#65	Europe	2	<20	780
		4	<20	1740
Pat#66	Europe	0	<20	989
		2	<20	761
Pat#67	Europe	0	<20	584
		2	<20	693
Pat#68	Europe	3	<20	704
		5	<40	900
Pat#69	Europe	0	<40	735
		2	<35	836

Table 4 : Description des paramètres immuno-virologiques des 20 patients de la cohorte ANRS CODEX aux deux temps post-inclusion étudiés.

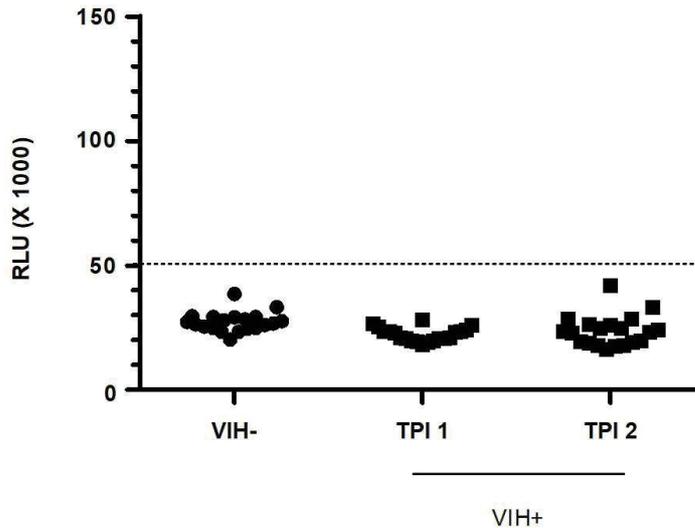


Figure 37 : Les 20 patients qui contrôlent spontanément la réplication virale ne présentent pas d'anticorps anti-ASP. Résultats du LIPS réalisé sur le plasma des 20 patients de la cohorte ANRS CODEX (VIH+) à deux temps post-inclusion (TPI 1 et TPI 2). Les valeurs obtenues du LIPS réalisé sur le plasma des patients séronégatifs français (VIH-) (Figure 29C) sont également représentées. Les données représentent la moyenne de la valeur médiane de 3 expériences réalisées en triplicats. La ligne en pointillé représente le seuil de positivité (51 000 RLU).

3. Dynamique de la réponse anticorps anti-ASP chez les patients #7, #9, #16 et #40

Afin d'analyser (i) la dynamique de la réponse anticorps anti-ASP et (ii) le lien éventuel entre la réplication virale et la réponse anticorps anti-ASP, j'ai suivi l'évolution de la réponse anticorps anti-ASP, de la CV et du taux de T CD4+ à différents intermédiaires pour les patients #7, #9, #16 et #40.

a. Dynamique de la réponse anticorps anti-ASP des patients #7, #9 et #16 du Burkina Faso

Les patientes #7, #9 et #16 présentaient des titres variés d'anticorps anti-ASP à S37 (Figure 32), et les patientes #7 et #16 avaient montré une dynamique de leur réponse anticorps anti-ASP entre S0 et S37 (Figure 34B). Cette tendance a été confirmée par l'analyse de leur réponse anticorps anti-ASP à des temps intermédiaires (Figure 38). Chez les 3 patientes, la réponse

anticorps anti-ASP a fluctué différemment entre S0 et S37 (Figure 38). L'intensité de la réponse anticorps anti-ASP de la patiente #16 a décliné entre S0 et S37 (Figure 38), mais malgré ce déclin son titre d'anticorps anti-ASP est resté supérieur à celui des patientes #7 et #9 (Figure 32). Pour la patiente #7, la réponse anticorps anti-ASP n'est devenue détectable qu'à S25, puis a augmenté jusqu'à S37 (Figure 38). Pour la patiente #9, le signal est resté stable entre S0 et S37 (Figure 38). Ces résultats suggèrent que la réponse anticorps anti-ASP préexistait avant l'arrêt de la prise d'ARV des patientes #9 et #16. La prise d'ARV a été de très courte durée chez les patientes du Burkina Faso (Table 1 ; Table 5). Les changements immuno-virologiques induits par les ARV chez ces patientes ont donc probablement été moins importants que ceux induits après plusieurs années d'ART chez le groupe de patients français présenté Figure 35 et chez le patient #40.

Patient	Origine géographique	ARV durant la grossesse	Durée de la prise d'ARV (semaines)	Nombre de semaines après arrêt de la prise d'ARV	Charge virale (copies d'ARN /mL de sang)	Nombre de T CD4+/µL de sang
P#7	Burkina Faso	ZDV	7	0	17280	ND
				5	ND	ND
				13	2492000	536
				25	ND	ND
				37	ND	ND
P#9	Burkina Faso	ZDV	7	41	1437000	523
				0	50320	ND
				13	279400	367
				25	ND	ND
				37	ND	ND
P#16	Burkina Faso	ZDV	4	41	394100	421
				0	Indétectable	ND
				14	ND	ND
				18	21160	477
				25	ND	ND
				37	3931	831

Table 5 : Description des paramètres immuno-virologiques des patientes #7, #9 et #16 à différents temps après l'arrêt de la prise d'ARV. ZDV : zidovudine ; ND : Données non disponibles.

Comme observé pour la réponse anticorps anti-ASP, la dynamique de la CV a fluctué différemment entre S0 et S37 pour les 3 patientes (Figure 38). Le rebond viral consécutif à l'arrêt de la prise d'ARV a été plus important pour la patiente #7 que pour les patientes #9 et #16 (Table 5 ; Figure 38). Ni la durée de la prise d'ARV, qui était identique pour les patientes #7 et #9, ni la nature des ARV reçus (Table 5) ne permettent d'expliquer cette disparité dans l'intensité du rebond viral. Le faible rebond viral de la patiente #16 suggère que la prise d'ARV n'était pas le seul facteur à l'origine de sa CV indétectable à S0. En outre, son maintien d'une

faible CV et l'augmentation de son taux de T CD4+ au cours des 37 semaines de suivi peuvent indiquer que son système immunitaire contrôle plus efficacement la réplication virale que celui des patientes #7 et #9 (Table 5). Si le profil de la patiente #16 est particulièrement intéressant, il ne permet cependant pas de déterminer la nature de la relation causale qui lie la CV, le taux de T CD4+ et la réponse anticorps anti-ASP. Dans tous les cas, son fort titre d'anticorps anti-ASP et sa faible CV suggèrent que le lien éventuel qui unit la réplication virale à la réponse anticorps anti-ASP est plus complexe que ne le suggéraient au premier abord les profils des patients sous ART, des patients *controllers* et du patient #40.

L'analyse comparée de la dynamique de la réponse anticorps anti-ASP et de la CV révèle un tout autre profil pour la patiente #7 (Figure 38). Chez cette patiente, l'augmentation de la réponse anticorps anti-ASP observée entre S25 et S37 a eu lieu lors d'une phase de déclin de la CV. En revanche, son taux de T CD4+ est resté stable au cours du suivi (Figure 38). Comme pour la patiente #16, la relation causale entre ces différents paramètres ne peut pas être établie. Néanmoins, le pic d'anticorps anti-ASP détecté postérieurement au pic de la CV peut indiquer que la réponse anticorps anti-ASP est apparue suite à une phase de forte réplication virale chez cette patiente. L'apparition de la réponse anticorps anti-ASP lors d'une phase de déclin de la CV pourrait également indiquer le développement préférentiel de la réponse anticorps anti-ASP lorsque l'équilibre entre le système immunitaire et la réplication virale se restaure.

Contrairement aux patientes #7 et #16, la CV et le taux de T CD4+ de la patiente #9 sont restés stables entre S0 et S37 (Table 5; Figure 38). Le maintien d'une CV et d'une réponse anticorps anti-ASP détectables mais modestes au cours des 37 semaines de suivi de la patiente #9 suggèrent une éventuelle association positive entre la réplication virale et l'intensité de la réponse anticorps anti-ASP.

Dans l'ensemble, la réponse anticorps anti-ASP a fluctué différemment après l'arrêt de la prise d'ARV chez les 3 patientes. La disparité des profils de ces patientes suggère que le lien potentiel qui existe *in vivo* entre la réplication virale et la réponse anticorps anti-ASP est complexe.

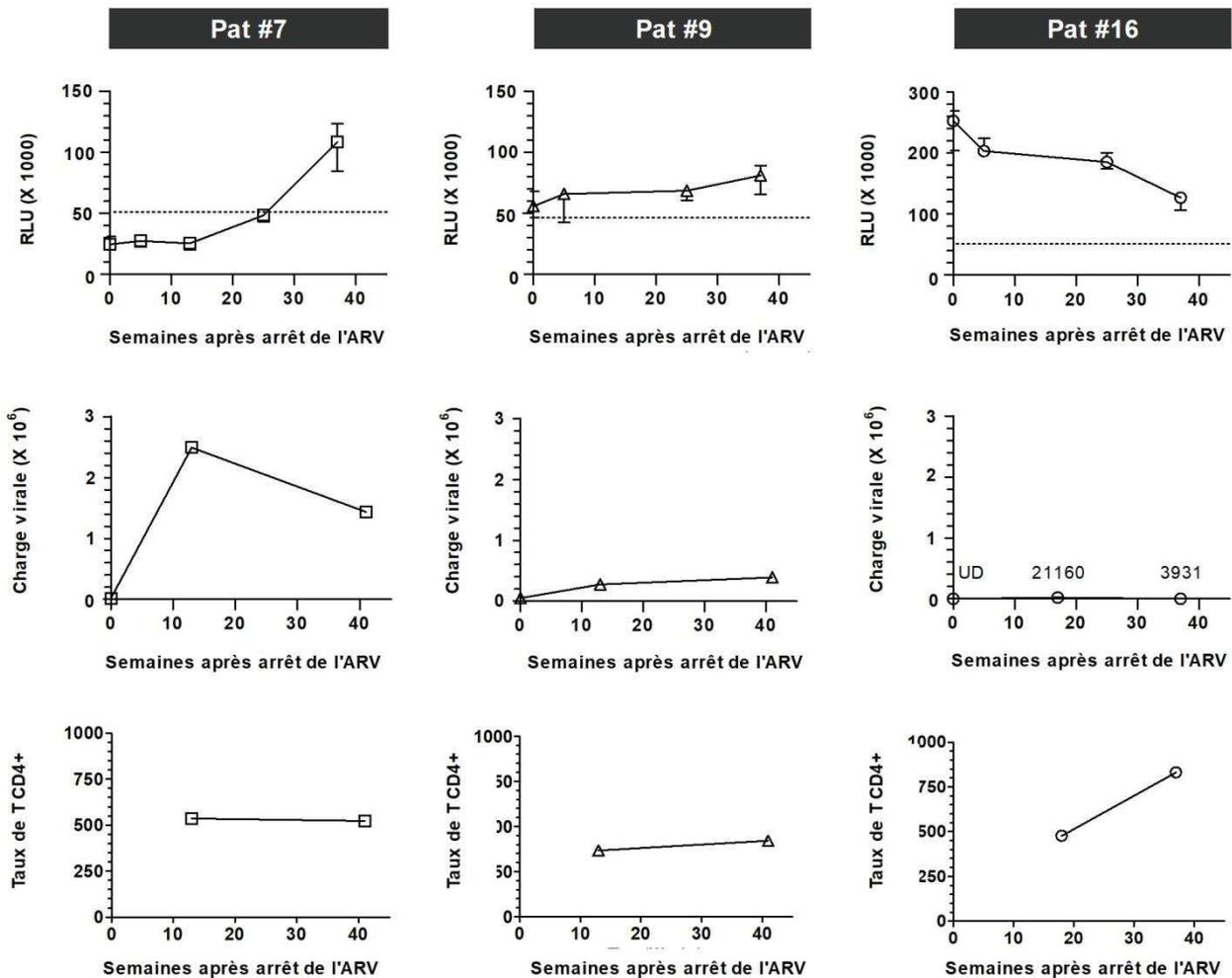


Figure 38 : Suivi de la réponse anticorps anti-ASP, de la CV et du taux de T CD4+ à différents temps après arrêt de l'ARV chez les patientes #7, #9 et #16. Résultats du LIPS réalisé sur le plasma des patientes #7, #9 et #16 à différents temps entre S0 et S37. Les données représentent la valeur médiane d'une expérience réalisée en triplicats. La ligne en pointillé représente le seuil de positivité (51 000 RLU). Les valeurs de la CV (copies d'ARN viral par mL de sang) et du taux de T CD4+ (nombre par µL de sang) déterminés dans le cadre de l'étude clinique PROMISE-PEP sont également représentés. Pour la patiente #16, les valeurs de la charge virale sont indiquées (UD=indétectable).

b. Dynamique de la réponse anticorps anti-ASP du patient #40 de la cohorte SEROCO

La réponse anticorps anti-ASP du patient #40 qui est détectée 2.5 années post-inclusion n'est plus détectée après l'initiation de l'ART (Figure 36A). Afin de déterminer si les changements immuno-virologiques induits par l'initiation de l'ART sont à l'origine de la disparition des anticorps anti-ASP chez ce patient, j'ai analysé sa réponse anticorps anti-ASP à 6 temps

intermédiaires : 4 temps avant l'ART (à l'inclusion et à 0.5, 1.5 et 4.5 années post-inclusion) et 2 temps après initiation de l'ART (7 et 10 années post-inclusion) (Table 6 ; Figure 39A). En parallèle, j'ai analysé l'évolution de la CV plasmatique et du taux de T CD4+ chez ce patient (Table 6 ; Figure 39B et C).

Patient	Origine géographique	Années post-inclusion	ART	Charge virale (copies d'ARN /mL de sang)	Nombre de T CD4+/ μ L de sang
Pat#40	European (France)	1	NT	125430	1200
		0,5	NT	11809	836
		1,5	NT	20504	840
		2,5	NT	4931	690
		4,5	NT	23668	490
		7	AZT ^a -DDC ^b	67722	139
		10	ABC ^c -DDI ^d -EFV ^e	76323	135
		13,5	AZT-DDC-InR ^f	Indétectable	58

Table 6 : Description des paramètres immunologiques et virologiques du patient #40 de la cohorte SEROCO à différents temps post-inclusion pré-ART et post-ART. a Azidothymidine ; b Dideoxycythidine ; c Abacavir ; d Didanosine ; e Efavirenz ; f Lopinavir.

Lors de son inclusion dans la cohorte SEROCO, soit au plus tard un an après sa date d'infection supposée, le patient #40 présentait un signal légèrement inférieur au seuil de positivité (Figure 39A). L'intensité du signal a ensuite diminué pendant 2 ans, puis a augmenté pour atteindre un pic 2.5 années post-inclusion. Suite à ce pic, le signal a diminué de nouveau et est resté sous le seuil de positivité. Le signal étant à la limite de la positivité à l'inclusion, il n'est pas à exclure que la réponse anticorps anti-ASP du patient #40 ait été mise en place au cours de la première année de son infection, avant de temporairement disparaître pendant 2 ans. Le déclin de la réponse anticorps anti-ASP précède l'initiation de l'ART (flèche verte, Figure 39B), et semble donc être indépendant des changements immuno-virologiques induits par le traitement.

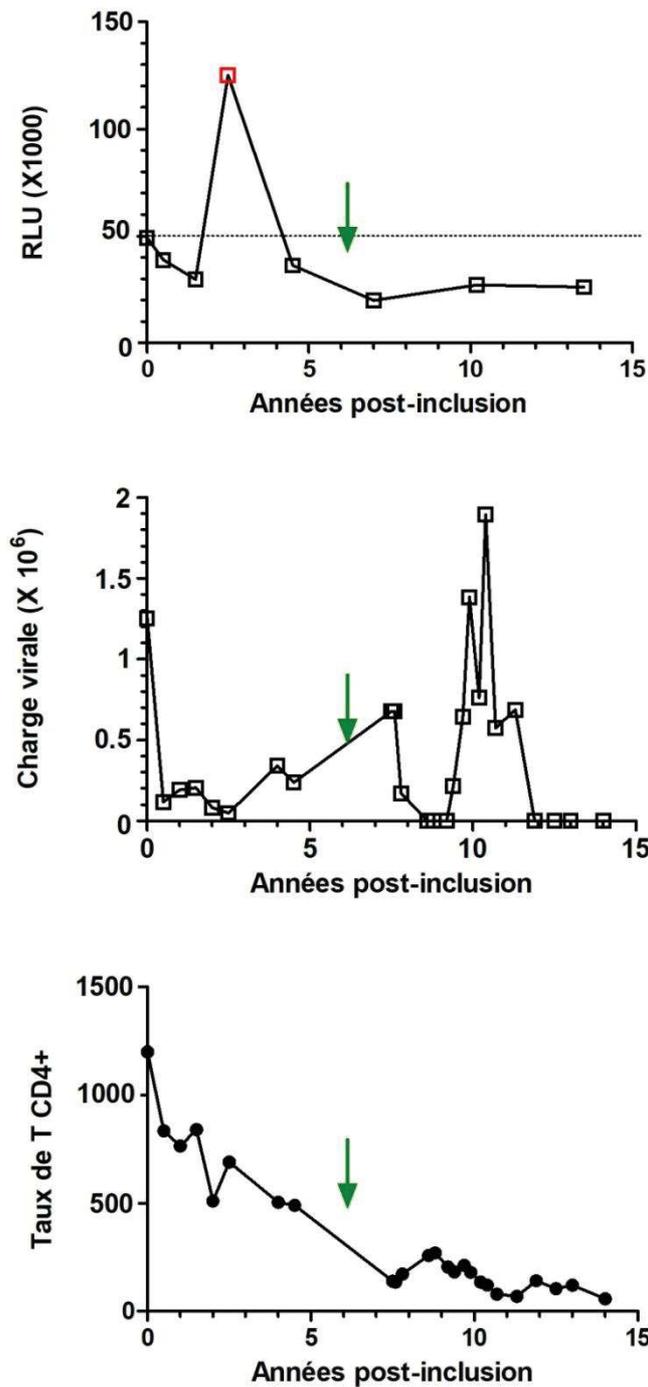


Figure 39 : Suivi de la réponse anticorps anti-ASP, de la CV et du taux de T CD4+ à différents temps post-inclusion chez le patient #40. Résultats du LIPS réalisé sur le plasma du patient #40 à l'inclusion, à 0.5 ; 1.5 et 2.5 années post-inclusion (pré-ART) et à 4.5 ; 7 ; 10 et 13.5 années post-inclusion (post-ART). Les données représentent la valeur médiane d'une expérience réalisée en triplicats. La ligne en pointillé représente le seuil de positivité (51 000 RLU). La CV (copies d'ARN par mL de sang) et le taux de T CD4+ déterminés dans le cadre de la cohorte SEROCO sont également représentés. L'initiation de l'ART est signalée par une flèche verte.

Si le déclin de la réponse anticorps anti-ASP est antérieur à l'initiation de l'ART, il est cependant concomitant d'une augmentation transitoire de la CV (Figure 39A et B). L'augmentation de la CV précède l'initiation de l'ART, et n'est donc pas due au traitement. L'inversion des tendances de la CV et de la réponse anticorps anti-ASP du patient #40 rappelle le profil du patient #7 (Figure 38). Cependant, contrairement à la patiente #7 dont le suivi n'a pas excédé 41 semaines, le profil de la patiente #40 indique que l'augmentation de la réponse anticorps anti-ASP est limitée dans le temps. Comme pour les patientes #7 et #16, la nature de la relation causale qui lie la CV et la réponse anticorps anti-ASP ne peut pas être déterminée.

Tout comme les patientes #7, #9 et #16, le patient #40 montre une réponse anticorps anti-ASP dynamique au cours du temps. Mes résultats suggèrent que la réponse anticorps anti-ASP est apparue au plus tard 3.5 années après la date d'infection supposée du patient #40, bien que le signal observé lors de son inclusion soulève la possibilité que cette réponse anticorps ait été mise en place au cours de sa première année d'infection. Dans tous les cas, **ces résultats constituent le premier suivi de la réponse anticorps anti-ASP au cours de l'infection naturelle par le VIH-1, et fournissent pour la première fois des indications sur la temporalité de l'expression d'ASP au cours de l'infection.**

4. Analyse de l'épitope d'ASP ciblé par les anticorps des patients #7, #9, #16 et #40

Afin de déterminer l'immunogénicité des différents domaines d'ASP, j'ai ensuite analysé leur contribution à l'épitope ciblé par les anticorps des patients #7, #9, #16 et #40. A cette fin, j'ai conçu des protéines de fusion entre la nano et 4 mutants d'ASP tronqués de différents domaines de la protéine (Figure 40A) :

- **Le mutant 1-62** qui présente uniquement la région N-terminale (acides aminés 1 à 62) d'ASP comprenant les deux triplets de cystéines et le motif riche en prolines (PxxP).

- **Le mutant 1-141** qui est dépourvu de l'extrémité C-terminale (acides aminés 141 à 189) d'ASP, et qui ne possède donc pas la région hypervariable V4.
- **Le mutant 26-189** qui est dépourvu des 26 premiers acides aminés d'ASP. Le mutant 26-189 possède le motif PxxP mais est dépourvu des deux triplets de cystéines.
- **Le mutant 60-189** qui est dépourvu de l'extrémité N-terminale d'ASP (acides aminés 1 à 60), et qui ne possède donc ni les triplets de cystéines ni le motif PxxP.

Dans un premier temps, j'ai évalué l'expression des mutants en réalisant un western-blot sur des lysats de HEK 293T transfectées. Comme indiqué Figure 40B (panneau de gauche), les différents mutants sont exprimés de manière globalement similaire, à l'exception du **mutant 1-141** dont le niveau d'expression est légèrement supérieur. Afin de m'affranchir de ce biais, j'ai ajouté dans chaque réaction de LIPS la quantité de mutants nécessaires pour obtenir un signal théorique de 1.10^7 LU (Figure 40B ; panneau de droite).

Dans un deuxième temps, j'ai évalué le bruit de fond associé à chaque mutant en réalisant un LIPS sur le plasma d'individus séronégatifs, comme décrit précédemment pour la forme entière (FE) de nano-ASP (voir **Figure 52 du matériel et méthodes** ; Figure 29B). Contrairement au **mutant 1-141**, le bruit de fond obtenu avec les mutants **1-62**, **26-189** et **60-189** est inférieur à celui obtenu avec nano-ASP FE (Figure 52). Cela suggère que l'extrémité N-terminale et la région centrale d'ASP sont toutes les deux impliquées dans le bruit de fond associé à nano-ASP FE. Le bruit de fond plus important du **mutant 1-141** peut également être dû à la plus grande quantité de protéines nécessaires à l'obtention d'un signal de 1.10^7 LU (Figure 40B ; panneau de droite).

Pour la suite des expériences, j'ai normalisé les différences de bruit de fond de chaque mutant par rapport au bruit de fond de nano-ASP FE (voir **partie III2f du matériel et méthodes**). J'ai ensuite exprimé les signaux normalisés de chaque mutant en pourcentage du signal obtenu avec la forme nano-ASP FE (Figure 41).

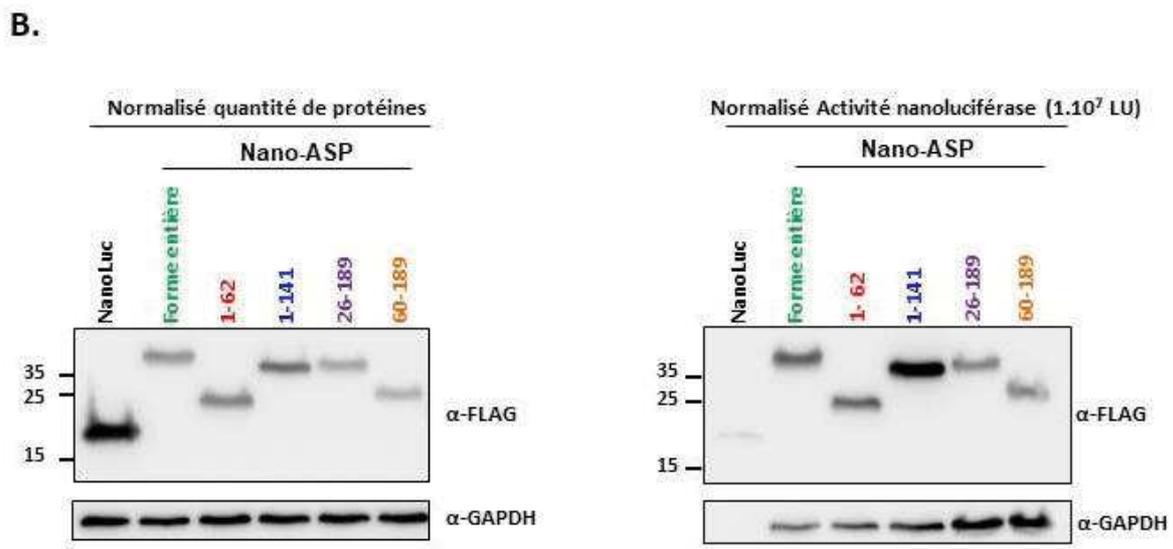
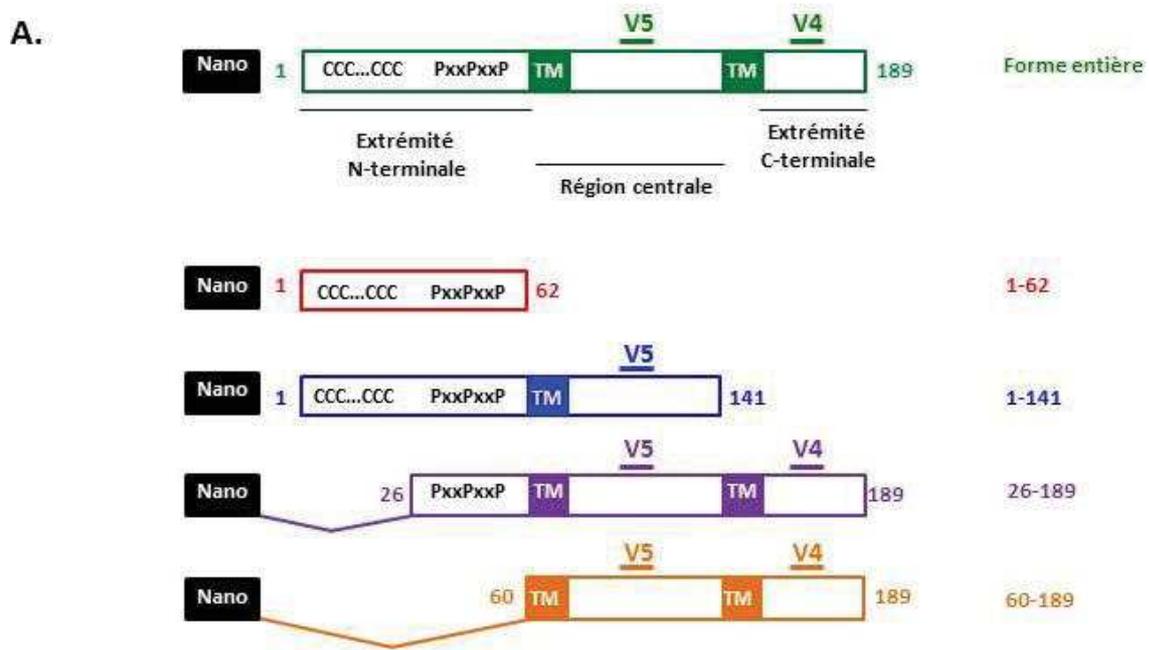


Figure 40 : Génération de mutants d'ASP pour déterminer l'épitope d'ASP ciblé *in vivo*. **A.** Représentation schématique des mutants de nano-ASP. Les numéros indiquent le positionnement des acides aminés des mutants. **B.** Détection par immuno-blot des mutants de nano-ASP. Les extraits protéiques déposés sur chaque piste ont été normalisés par rapport à la quantité totale de protéines (à gauche) ou par rapport à l'activité de la nano (à droite ; dépôt de la quantité de lysat nécessaire à l'obtention de 1.10⁷ LU). Le signal est révélé à l'aide d'un anticorps ciblant la séquence Flag située en N-terminal de la nano.

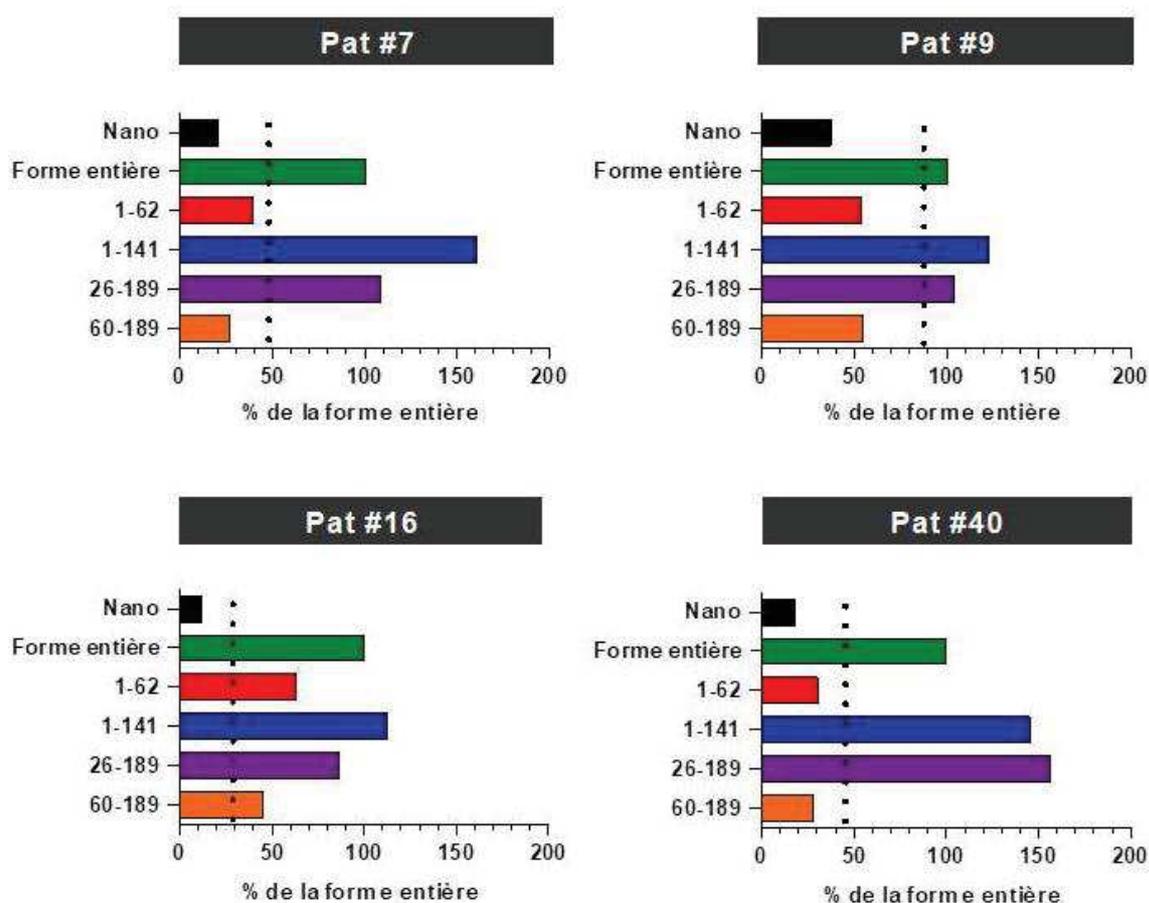


Figure 41 : Contribution des différents domaines d'ASP à l'épitope ciblé par les anticorps des patients #7, #9, #16 et #40. Résultats du LIPS réalisé sur le plasma des patients #7, #9 et 16 (S37) et le plasma du patient #40 (2.5 années post-inclusion) avec la nano, la forme entière de nano-ASP ou différents mutants de nano-ASP. Pour chaque mutant, le signal a été normalisé pour les différences de bruit de fond par rapport à la forme entière de nano-ASP. Le signal de chaque mutant est exprimé en pourcentage du signal obtenu avec la forme entière de nano-ASP. La ligne en pointillé correspond au seuil de positivité (51 000 RLU), exprimé en pourcentage du signal obtenu avec la forme entière de nano-ASP. Les données représentent la valeur médiane d'une expérience réalisée en triplicats.

J'ai analysé la réponse anticorps dirigée contre les 4 mutants de nano-ASP dans le plasma des patients #7, #9, #16 et #40 (Figure 41). Pour les 4 patients, je n'ai détecté aucune diminution du signal en tronquant les extrémités N-terminale (**mutant 26-189**) et C-terminale (**mutant 1-141**) d'ASP. J'ai même observé une augmentation du signal pour les 4 patients en l'absence des résidus 141-189 d'ASP, ainsi que pour le patient #40 en l'absence des résidus 1-26 (Figure 41). Ces augmentations du signal peuvent indiquer une meilleure accessibilité de l'épitope d'ASP aux anticorps avec ces deux mutants, ou être dû à la quantité plus importante de protéines

dans la réaction pour le **mutant 1-141**. Dans tous les cas, ces résultats suggèrent fortement que les régions 1-26 et 141-189 d'ASP ne sont pas ciblées par les anticorps des patients (Figure 41).

En l'absence des résidus 1 à 60 (**mutant 60-189**) et des résidus 62 à 189 (**mutant 1-62**) d'ASP, le signal des 4 patients diminue fortement (Figure 41). Pour le patient #16 uniquement, le signal reste supérieur au seuil de positivité avec le mutant 1-62 (Figure 41). Il est donc possible que la réponse anticorps anti-ASP de la patiente #16 cible davantage de régions antigéniques d'ASP que la réponse anticorps des patients #7, #9 et #40, comme le suggérait déjà son plus fort titre d'anticorps anti-ASP (Figure 32). La région 1-26 n'étant pas ciblée par les anticorps, la diminution du signal observée avec le **mutant 60-189** peut être attribuée à la déplétion de la région 26-60 d'ASP qui comprend le motif PxxP (Figure 40; Figure 41). Pour les patients #7, #9 et #40, le motif PxxP et la région centrale 60-141 d'ASP comprenant V5 ne semblent pas être reconnues lorsqu'elles sont isolées (mutants **1-62** et **60-189**). **Il est donc probable que les régions 26-60 et 60-141 d'ASP contribuent toutes les deux à la reconnaissance d'ASP par les anticorps, soit en participant directement à l'épitope d'ASP, soit indirectement en favorisant le repliement de la protéine.**

Dans l'ensemble, ces résultats suggèrent fortement que les anticorps des patients #7, #9, #16 et #40 **ciblent un ou plusieurs épitopes conformationnels conservé(s) situés entre les résidus 26 et 141 d'ASP**. La contribution des motifs PxxP et V5 à l'épitope d'ASP devra être évaluée en réalisant des versions d'ASP spécifiquement mutées de ces deux motifs.

La détection d'anticorps anti-ASP dans les échantillons biologiques de 4 patients non traités (patients #7, #9, #16 et #40) a permis de **confirmer la présence d'anticorps anti-ASP au cours de l'infection**. Par ailleurs, le suivi de l'évolution de la réponse anticorps anti-ASP chez ces patients suggère que **l'intensité de la réponse anticorps anti-ASP fluctue au cours de l'infection, probablement en relation avec des paramètres immuno-virologiques qui restent à être déterminés**.

L'absence d'anticorps anti-ASP chez les patients *controllés* et sous ART **suggère une association positive entre la réplication virale et la réponse anticorps anti-ASP** chez ces patients. Cette hypothèse est confortée par la détection d'anticorps anti-ASP après une phase de forte réplication virale chez la patiente #7. Cependant, **(i)** les tendances inversées de la réponse anticorps anti-ASP et de la virémie chez les patients #7 et #40, ainsi que **(ii)** la faible CV de la patiente #16 suggèrent que **le lien qui unit potentiellement la réplication virale et la réponse anticorps anti-ASP est complexe**. L'appréhension de la relation entre ces deux paramètres nécessiterait l'étude d'un plus grand nombre de patients présentant des profils immuno-virologiques variés, ainsi qu'un suivi clinique couvrant différentes phases de l'infection naturelle.

Enfin, mes résultats suggèrent que les anticorps anti-ASP ciblent un ou plusieurs **épitopes conformationnels conservés qui incluraient potentiellement le motif PxxP et la région hypervariable V5 d'ASP**. La conception de nouveaux mutants pourrait être envisagée pour étudier plus finement l'épitope d'ASP.

II. Etude de l'expression du transcrit d'*asp* dans des cellules de patients infectés par le VIH-1

Différentes études ont rapporté l'expression préférentielle de la transcription antisens du VIH-1 dans les cellules infectées qui expriment peu de transcrits sens, et qui produisent donc peu de virions (Kobayashi-Ishihara et al. 2012, 2018; Laverdure et al. 2012; Arpin-André et al. 2014). Cette observation a été récemment confortée par la détection de transcrits d'*asp* dans les T CD4+ quiescents isolés de patients (Zapata et al. 2017).

Afin d'analyser le profil d'expression des transcrits d'*asp in vivo*, j'ai recherché la présence de transcrits d'*asp* dans des cellules primaires isolées de patients infectés par le VIH-1. Dans un premier temps, j'ai mis au point une technique de RT-qPCR brin-spécifique permettant la quantification spécifique et relative des transcrits d'*asp*. En utilisant cette technique, j'ai ensuite détecté des transcrits d'*asp* dans deux lignées cellulaires infectées de manière latente puis dans des cellules primaires de patients.

Ce projet a nécessité une importante phase de développement technologique, et de nombreuses optimisations de la RT-qPCR brin-spécifique et des méthodes d'isolation des cellules primaires ont été nécessaires pour détecter les transcrits d'*asp*. Les résultats que je présente dans cette partie sont donc préliminaires.

1. Développement d'une technique de RT-qPCR brin-spécifique pour détecter les transcrits d'*asp*

a. Principe de la technique de RT-qPCR brin-spécifique

Dans la décennie suivant la découverte du gène *asp*, des transcrits antisens du VIH-1 ont été détectés dans des lignées de lymphocytes T chroniquement infectés, en utilisant des amorces de réverse transcription (RT) puis de PCR spécifiques (Michael et al. 1994; Vanhée-Brossollet et al. 1995). Cependant, dans ces deux études, aucun contrôle n'a permis de vérifier que le signal détecté provenait bien des ADNc réverse transcrits à l'aide de l'amorce de RT d'*asp*. En effet, la réverse transcription des transcrits sens et antisens peut avoir lieu en l'absence d'amorces spécifiques, du fait de l'amorçage des transcrits par de petits acides nucléiques contaminants d'origine cellulaire ou par des structures secondaires tiges-boucles de l'ARN

(Gunji et al. 1994; Timofeeva et Skrypina 2001; Beiter et al. 2007; Feng et al. 2012). Ce phénomène général, qualifié d'**auto-amorçage**, peut-être évalué en effectuant une réaction de RT en l'absence d'amorces spécifiques.

En réalisant ce contrôle d'auto-amorçage, l'équipe du Pr Benoît Barbeau a auparavant rapporté l'importante contribution de ce phénomène au signal observé lors de l'amplification du transcrit d'*asp* dans des HEK transfectées (Landry et al. 2007). Cette même étude a démontré que les transcrits sens étaient les principaux contributeurs de ce phénomène d'auto-amorçage. L'activité transcriptionnelle sens du VIH-1 étant supérieure d'un facteur 25-1000 à l'activité transcriptionnelle antisens dans les cellules lymphoïdes et myéloïdes (Kobayashi-Ishihara et al. 2012, 2018; Laverdure et al. 2012), l'équipe du Pr Benoit Barbeau a développé en collaboration avec notre équipe une technique de **RT-PCR brin-spécifique** qui permet de détecter les transcrits antisens en s'affranchissant du signal dû à l'auto-amorçage des transcrits sens (Landry et al. 2007).

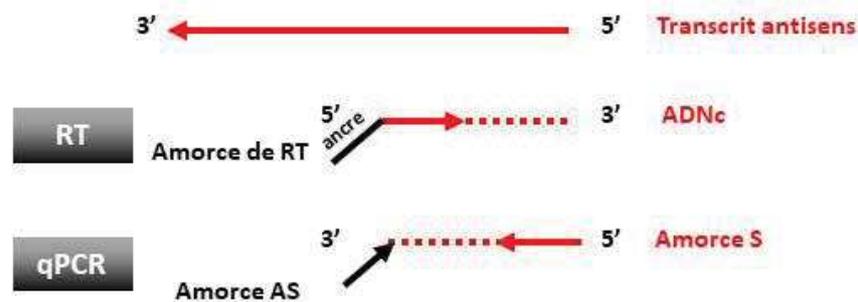


Figure 42 : Principe général de la technique de RT-qPCR brin-spécifique. L'amorce de RT comporte en 5' une séquence non complémentaire au transcrit d'*asp* (ancree). La qPCR est réalisée à l'aide d'une amorce sens (S) qui s'hybride en 3' de l'ADNc d'*asp* et d'une amorce antisens (AS) complémentaire de l'ancree.

Cette technique repose sur l'ajout d'une **séquence non complémentaire (séquence ancree)** du transcrit d'*asp* en 5' de l'amorce utilisée pour l'étape de RT (Figure 42). En utilisant une amorce antisens complémentaire de la séquence ancree lors de l'étape de PCR, seuls les ADNc réverse transcrits à l'aide des amorces de RT sont amplifiés. En utilisant cette technique, le signal dû au phénomène d'auto-amorçage dans les HEK transfectées de l'étude de Landry et al a été drastiquement diminué. Plus récemment, cette technique a également été utilisée pour détecter les transcrits antisens du VIH-1 par RT-PCR dans des cellules transfectées (Kobayashi-

Ishihara et al. 2012) et par RT-PCR quantitative (RT-qPCR) dans des cellules primaires isolées de patients infectés (Zapata et al. 2017).

b. Validation des amorces de RT-qPCR d'*asp* utilisées

Afin de détecter les transcrits d'*asp* dans des cellules infectées par le VIH-1, nous avons conçu une amorce de RT complémentaire de l'extrémité 5' conservée de l'ORF d'ASP (Figure 43A). Cette amorce comporte une séquence ancre en 5' comme décrit précédemment (Figure 42), et a été conçue pour s'hybrider à une séquence consensus d'*asp* générée par l'alignement de séquences de plusieurs sous-types et CRF du VIH-1. L'amorce de RT d'*asp* peut théoriquement s'hybrider aux 4 différents transcrits d'*asp* qui ont été décrits *in vitro* (Michael et al. 1994; Landry et al. 2007; Kobayashi-Ishihara et al. 2012; Saayman et al. 2014) (Figure 43A). Les amorces de qPCR sens et antisens spécifiques d'*asp* s'hybrident respectivement à l'extrémité 3' et à la séquence ancre de l'ADNc d'*asp*.

J'ai testé les amorces d'*asp* en réalisant une RT-qPCR sur les transcrits de deux types cellulaires infectés *in vitro* avec un virus NLAd8: des DC dérivées de monocytes primaires (DC Ad8) et des cellules Jurkat (Jurkat Ad8). Afin de vérifier l'absence de phénomènes d'auto-amorçage lors de l'étape de RT et l'absence d'interférence entre les amorces de RT d'*asp* et des gènes de ménage, j'ai effectué 3 réactions de RT sur les DC Ad8 et les Jurkat Ad8 (données non présentées):

- Une réaction de RT en présence des amorces spécifiques d'*asp* et des gènes de ménage
- Une réaction de RT en présence de l'amorce d'*asp* seule
- Une réaction de RT sans amorce (contrôle d'auto-amorçage)

Les ADNc obtenus à l'issue de chaque réaction de RT ont ensuite été amplifiés par qPCR. En l'absence d'amorces de RT, je n'ai détecté aucun signal par qPCR dans les DC Ad8 et les Jurkat Ad8 (données non présentées), indiquant l'absence de phénomènes d'auto-amorçage au cours de la RT pour les deux types cellulaires. Par ailleurs, je n'ai observé aucune différence dans l'intensité du signal en effectuant la réaction de RT en présence des amorces d'*asp* et des gènes de ménage ou en présence de l'amorce d'*asp* seule (données non présentées), indiquant

que les différentes amorces de RT peuvent être employées simultanément sans impacter la qualité du signal.

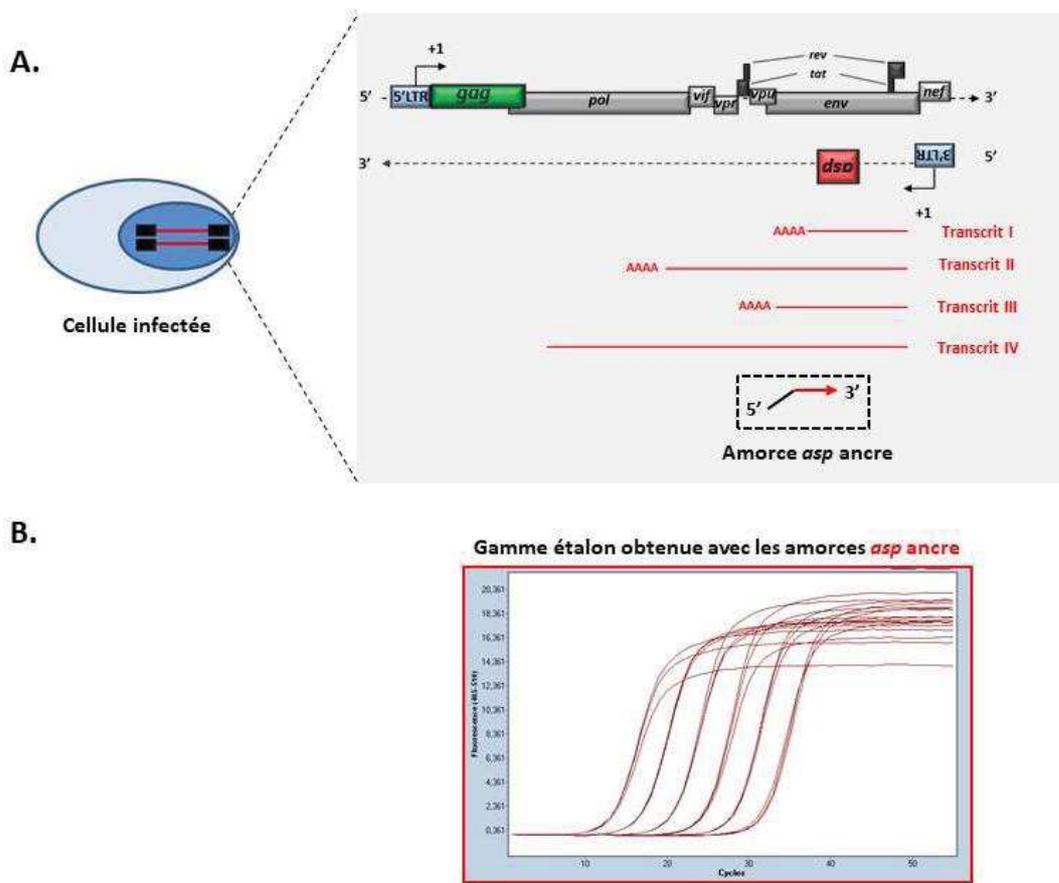


Figure 43 : Développement de la technique de RT-qPCR brin-spécifique pour la détection des transcrits d'*asp* dans des cellules infectées par le VIH-1. A. Représentation schématique du génome proviral du VIH-1 et de l'amorce de RT utilisée pour la détection des transcrits d'*asp* dans les cellules infectées. L'amorce de RT s'hybride dans l'ORF d'ASP et peut théoriquement se lier aux 4 types de transcrits antisens du VIH-1 qui ont été décrits *in vitro* : le transcript I (Michael et al. 1994), le transcript II (Landry et al. 2007), le transcript III (Kobayashi-Ishihara et al. 2012) et le transcript IV (Saayman et al. 2014). **B.** Signal fluorescent obtenu en réalisant une qPCR sur les dilutions de la gamme d'amplicons d'*asp* allant de 10^2 à 10^7 copies d'ADN/ μ L. Chaque réaction a été réalisée en triplicats. Les résultats ont été obtenus avec le logiciel LightCycler480 (Roche life Science).

La spécificité du signal détecté par qPCR peut être évaluée de deux manières : **(i)** en séquençant les amplicons obtenus, et **(ii)** en comparant la température du pic de la courbe de fusion (T_m) des amplicons à celle d'une séquence d'ADN de référence (gamme étalon). La spécificité du signal est également vérifiée en réalisant une qPCR en l'absence de matrice d'ADN (contrôle sans matrice). Pour les réactions de RT-qPCR que j'ai réalisées, **j'ai donc**

considérés comme spécifiques les signaux (i) détectés à un cycle seuil (Ct) inférieur à celui du signal aspécifique du contrôle sans matrice et (ii) dont la T_m est identique à celle de la gamme étalon de chaque gène considéré.

Après avoir validé par séquençage la spécificité des signaux obtenus par qPCR avec les Jurkat Ad8, j'ai utilisé les amplicons d'*asp* et des gènes de ménage *actine beta*, *rpl19* et *hprt* obtenus avec ces cellules pour générer des gammes étalon de référence pour chaque gène. Chaque gamme comprenait des dilutions d'amplicons de 10⁰ à 10⁷ copies d'ADN/μL. En les utilisant comme matrice dans une réaction de qPCR, j'ai obtenu un signal spécifique pour toutes les dilutions de la gamme *asp*. Cependant, la reproductibilité de ce signal était insuffisante pour les dilutions comportant théoriquement 10⁰ et 10¹ copies/μL, probablement à cause du faible nombre de copies d'ADN dans la réaction initiale. Par conséquent, je n'ai pas utilisé ces deux dilutions pour générer la courbe d'étalonnage d'*asp* (Figure 43B).

La technique de RT-qPCR brin-spécifique que j'ai développée me permet donc de détecter les transcrits d'*asp* présents dans la réaction à partir d'une copie/μL, mais ne me permet pas de quantifier ces transcrits lorsqu'ils sont présents à une concentration inférieure à 100 copies/μL (ce qui correspond à un Ct de 32 ; Figure 43B). **Pour la suite des expériences, j'ai utilisé la T_m obtenue avec la gamme étalon d'*asp* pour vérifier la spécificité du signal obtenu dans les échantillons de cellules infectées.**

Dans l'ensemble, j'ai développé une technique de qRT-PCR brin-spécifique qui permet la réverse transcription spécifique des transcrits d'*asp* isolés de cellules infectées *in vitro*, ainsi que l'amplification spécifique par qPCR des ADNc obtenus. Cette technique permet de détecter des transcrits d'*asp* présents dans l'échantillon initial à partir d'une concentration de 1 copie/μL. La capacité de notre technique à détecter des transcrits présents à une très faible concentration dans l'échantillon initiale est particulièrement importante pour *asp*, étant donné **(i)** la faible abondance des transcrits antisens dans les cellules infectées (Kobayashi-Ishihara et al. 2012; Laverdure et al. 2012; Zapata et al. 2017), **(ii)** le fort taux de cellules infectées porteuses de provirus défectueux *in vivo* (Ho et al. 2013) et **(iii)** le faible nombre de cellules de patients infectés dont nous disposions initialement.

2. Détection des transcrits d'*asp* dans des lignées cellulaires infectées de manière latente

La transcription antisens du VIH-1 étant préférentiellement active lorsque la transcription sens est faible (Landry et al. 2007; Kobayashi-Ishihara et al. 2012; Laverdure et al. 2012), j'ai analysé l'expression des transcrits d'*asp* et de *gag* dans deux lignées cellulaires infectées par le VIH-1 de manière latente : la lignée myéloïde U1 et la lignée lymphoïde ACH-2. A l'état basal, le niveau d'expression d'*asp* était similaire dans les deux lignées, mais l'expression de *gag* était supérieure dans les ACH-2. Dans la lignée myéloïde U1 et dans la lignée lymphoïde ACH-2, le niveau d'expression de *gag* était respectivement supérieur d'un facteur 10 et d'un facteur 10^4 à celui d'*asp* (Figure 44), en accord avec l'importante activité transcriptionnelle antisens du VIH-1 au préalable décrite par notre équipe dans la lignée U1 (Landry et al. 2007) et dans des cellules primaires d'origine myéloïde (Laverdure et al. 2012).

Des études réalisées par différentes équipes, y compris la nôtre, ont rapporté l'impact positif d'activateurs de la voie NF-kB sur la transcription antisens du VIH-1 dans des lignées lymphocytaires transfectées ou infectées (Michael et al. 1994; Vanhée-Brossollet et al. 1995; Peeters et al. 1996; Kobayashi-Ishihara et al. 2012; Arpin-André et al. 2014). Afin d'analyser l'impact de l'activation de la voie NF-kB sur l'expression d'*asp* endogène, j'ai analysé l'expression d'*asp* dans les lignées U1 et ACH-2 avant et après traitement par des activateurs de la voie NF-kB. L'activation de la voie NF-kB par la cytokine TNF- α (U1) ou par le double traitement PMA/ionomycine (ACH-2) augmente d'un facteur 10 l'expression des transcrits d'*asp* dans les deux lignées (Figure 44), confirmant le rôle exercé par NF-kB dans l'activation de la transcription antisens du VIH-1 (Michael et al. 1994; Kobayashi-Ishihara et al. 2012; Arpin-André et al. 2014). Comme attendu, l'activation de la voie NF-kB augmente également l'expression de *gag* dans les deux lignées (Figure 44). Cette augmentation est plus faible pour la lignée ACH-2 que pour la lignée U1, mais cette différence est probablement due à la plus forte expression basale de *gag* dans les ACH-2. Les ACH-2 étant une lignée latente, la forte expression basale de *gag* est surprenante et peut indiquer que la lignée que j'ai utilisée a dérivé.

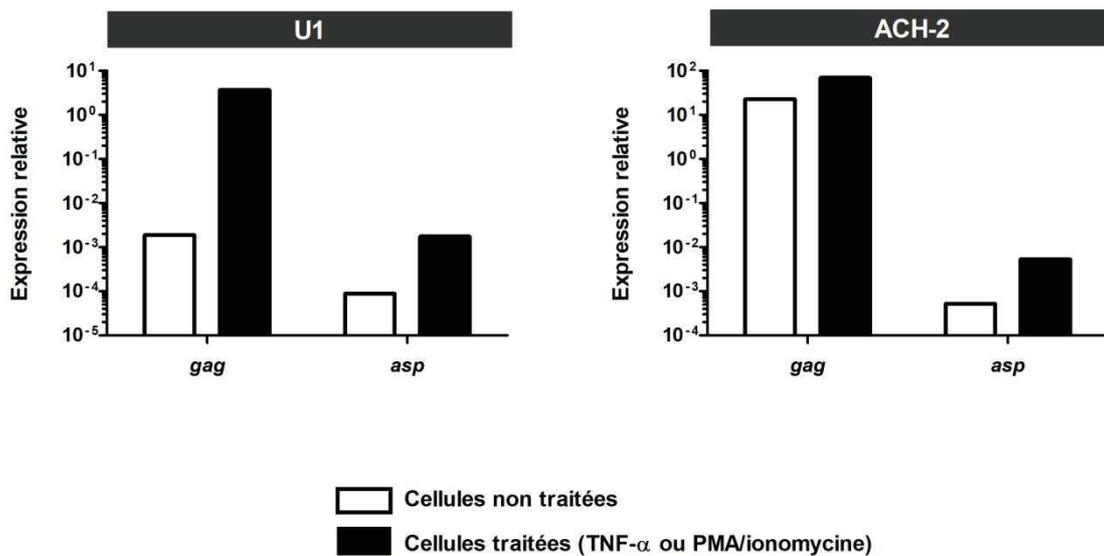


Figure 44 : Analyse de l'expression du transcrite d'*asp* dans deux lignées cellulaires infectées de manière latente, avant ou après traitement avec des activateurs de la voie NF-κB. Expression relative des transcrits de *gag* et d'*asp* dans la lignée myéloïde U1 et dans la lignée lymphoïde ACH-2 non traitées (barres blanches) ou après 4h de traitement au TNF-α (U1) ou à la PMA/ionomycine (ACH-2).

Dans l'ensemble, les transcrits d'*asp* endogènes sont détectés dans deux lignées infectées de manière latente, et l'expression d'*asp* augmente lorsque les cellules sont traitées avec des activateurs de la voie NF-κB. Le rapport des transcriptions sens et antisens du VIH-1 est plus faible dans la lignée myéloïde U1 que dans la lignée lymphoïde ACH-2, ce qui conforte la plus forte activité transcriptionnelle antisens du VIH-1 précédemment observée dans les cellules d'origine myéloïde. Du fait de la forte expression basal de *gag* dans les ACH-2, ces résultats doivent cependant être interprétés avec précaution.

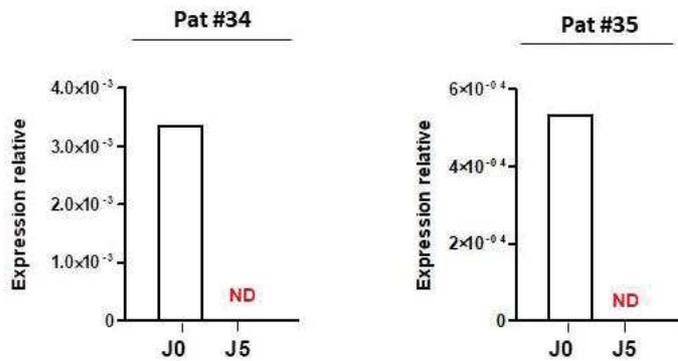
3. Détection des transcrits d'*asp* dans les cellules de patients infectés par le VIH-1

J'ai ensuite analysé l'expression d'*asp* dans des cellules primaires isolées du groupe de patientes du Burkina Faso et du groupe de patients sous ART au préalable étudiés pour leur réponse anticorps anti-ASP (Figure 31 ; Figure 35). Comme mentionné précédemment, de nombreuses optimisations du mode de préparation des échantillons (isolation des cellules primaires et d'extraction d'ARN) ont été nécessaires pour détecter les transcrits d'*asp* dans ces cellules primaires. Par conséquent, je n'ai pu mener à bien la détection des transcrits d'*asp* que chez quelques patients.

Dans le cadre de l'étude clinique PROMISE-PEP, les cellules mononucléées du sang périphérique (PBMC) ont été isolées des patientes à différents temps après l'arrêt de la prise d'ARV (Nagot et al. 2016). Pour chaque patiente, je disposais d'un unique culot sec de PBMC isolées à S0 (Figure 30). Malheureusement, je n'ai pas détecté de signaux spécifiques d'*asp* par RT-qPCR dans ces échantillons, potentiellement du fait de leur mode de préparation (culots secs et extraction d'ARN au phénol/chloroforme, **voir partie II2b du Matériel et Méthodes**).

Par la suite, j'ai analysé la présence des transcrits d'*asp* dans des cellules primaires fraîchement isolées d'échantillons de sang périphérique des patients sous ART précédemment décrits (Figure 35). L'activité transcriptionnelle antisens du VIH-1 est plus active dans les DC et les macrophages que dans les T CD4+ activés (Kobayashi-Ishihara et al. 2012; Laverdure et al. 2012). Les macrophages étant absents du sang périphérique et les DC représentant uniquement 0.2% des PBMC, j'ai analysé l'expression d'*asp* dans les T CD4+ totaux du sang périphérique des patients. En effet, les T CD4+ circulants comprennent une minorité de T CD4+ activés, et présentent donc majoritairement un phénotype quiescent associé à une faible activité transcriptionnelle sens. En outre, la présence de transcrits antisens du VIH-1 avait déjà été rapportée dans plusieurs lignées de T CD4+ chroniquement infectées (Vanhée-Brossollet et al. 1995; Landry et al. 2007; Kobayashi-Ishihara et al. 2012; Saayman et al. 2014; Zapata et al. 2017) et, plus récemment, dans les T CD4+ totaux isolés de patients infectés par le VIH-1 (Zapata et al. 2017).

A.



B.

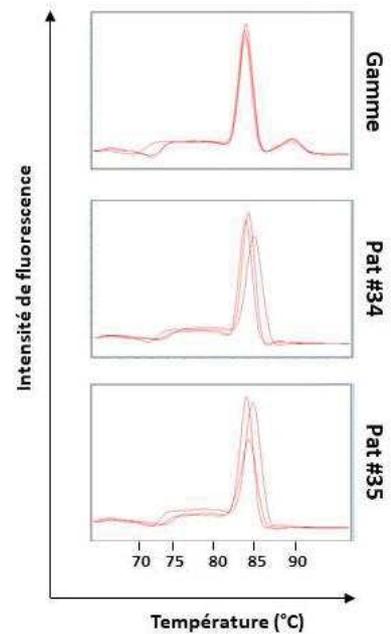


Figure 45 Des transcrits d'*asp* sont détectés dans les T CD4+ totaux des patients #34 et #35. A. Quantification relative des transcrits d'*asp* dans les T CD4+ totaux des patients #34 et #35. Les valeurs représentent l'expression relative du gène *asp* normalisé par rapport à l'expression des gènes *actine beta*, *rpl19* et *hprt* dans les cellules (expression relative). Les données représentent les résultats obtenus d'une expérience de qPCR réalisée en triplicats. **B.** Représentation de la courbe de fusion obtenue avec les amplicons d'*asp* amplifiés des T CD4+ totaux des patients #34 et #35. La courbe de fusion obtenue dans la même expérience avec la gamme étalon *asp* ancre (dilution à 10^4 copies d'amplicons/ μ L) est également représentée. Les résultats ont été obtenus avec le logiciel LightCycler480 (Roche life Science).

Afin de détecter les transcrits d'*asp* dans les T CD4+ totaux des patients sous ART, j'ai effectué des mises au points sur différentes étapes du protocole d'isolation des T CD4+ et de la RT-qPCR brin-spécifique. Ces optimisations m'ont permis de détecter des signaux spécifiques indiquant la présence de transcrits d'*asp* dans les T CD4+ totaux de deux patients sous ART (patients #34 et #35 ; Figure 45A). Ces signaux spécifiques ont cependant été détectés après 36 cycles de qPCR, soit à un Ct supérieur au Ct de la plus faible dilution de la gamme utilisée pour générer la gamme étalon d'*asp* (Dilution 10^2 copies/ μ L ; Figure 45B). Afin de représenter graphiquement les signaux obtenus pour *asp* chez ces deux patients, j'ai tout de même quantifié l'expression du transcrit d'*asp* relativement aux transcrits des gènes de ménage en extrapolant la droite d'étalonnage de la gamme d'*asp* (Figure 43B ; Figure 45A). La Tm des amplicons d'*asp* de ces 2 patients attestait de la spécificité du signal obtenu (Figure 45B).

Dans l'ensemble, j'ai détecté des signaux spécifiques indiquant la présence de transcrit d'*asp* dans les T CD4+ totaux des patients #34 et #35. Bien que préliminaires, mes résultats sont en accord avec l'étude de Zapata et al qui ont détecté des transcrits d'*asp* dans les T CD4+ totaux isolés de 3 patients sous ART. Mes résultats sont également en lien avec les études précédentes qui ont rapporté une plus forte transcription antisens du VIH-1 dans les cellules présentant une faible transcription sens (Kobayashi-Ishihara et al. 2012; Laverdure et al. 2012). En revanche, mes résultats sont en apparente contradiction avec une étude récente qui a rapporté la présence de transcrits d'*asp* dans les T CD4+ totaux de patients uniquement après leur ré-activation *ex vivo* (Mancarella et al. 2019). Je reviendrai sur les différences entre nos deux études dans la discussion.

En conclusion pour cette partie, j'ai détecté **la présence de transcrits d'*asp* dans les T CD4+ totaux de 2 patients sous ART**, ce qui confirme la récente détection du transcrit d'*asp* dans les T CD4+ totaux de patients sous ART (Zapata et al. 2017), et l'hypothèse selon laquelle l'activité transcriptionnelle antisens du VIH-1 est plus importante dans un contexte cellulaire de faible transcription sens (Landry et al. 2007; Kobayashi-Ishihara et al. 2012; Laverdure et al. 2012; Saayman et al. 2014). Plus généralement, mes résultats confirment que **des transcrits d'*asp* sont produits *in vivo***.

La principale limitation technique à laquelle j'ai été confrontée pour l'étude des transcrits d'*asp* est le faible nombre initial de cellules de patients disponibles. Ce nombre, inconnu pour les PBMC des patientes du Burkina Faso, s'élevait à un maximum de 3.10^6 de T CD4+ pour les patients sous ART. Le nombre de cellules quiescentes infectées porteuses d'un provirus intact ayant été estimé à 1 sur 10^6 cellules (Ho et al. 2013), et le nombre de transcrits antisens du VIH-1 à 5-25 copies/cellule (Zapata et al. 2017), je disposais d'après ces prédictions d'un maximum de 15-75 copies de transcrits d'*asp* dans la réaction de RT initiale.

Afin de surmonter ces limitations techniques et d'approfondir l'étude des transcrits d'*asp*, un projet de recherche annexe a été initié en 2019 au sein de notre équipe suite à l'obtention d'un contrat de pré-maturation auprès de l'INSB. **Ce projet de recherche s'inscrit dans l'approche globale visant à évaluer l'emploi d'ASP comme biomarqueur potentiel du suivi de l'évolution de la pathologie**, qui a fait l'objet du **dépôt d'un brevet** auprès du CNRS.

Discussion

En détectant des transcrits d'*asp* et des anticorps anti-ASP dans des échantillons biologiques de patients, j'ai **confirmé l'expression du gène *asp* au cours de l'infection par le VIH-1**, ce qui avait déjà été fortement suggéré par plusieurs études (Vanhée-Brossollet et al. 1995; Berger et al. 2015; Bet et al. 2015; Zapata et al. 2017). Dans la discussion, je reviens sur les principaux résultats que j'ai obtenus de l'étude des **anticorps anti-ASP** et des **transcrits d'*asp***. Je discute également des hypothèses relatives au profil d'expression d'ASP et de ses transcrits *in vivo* qui peuvent être émises à partir de mes résultats.

I. Détection des transcrit d'*asp* chez le patient

J'ai détecté des transcrits d'*asp* dans les T CD4+ totaux de patients sous ART, ce qui confirme les résultats de l'étude de Zapata et al qui a également détecté des transcrits d'*asp* dans les T CD4+ de patients (Zapata et al. 2017). Nos deux études ont été effectuées en utilisant une RT-qPCR à l'aide d'une amorce de RT spécifique des transcrits d'*asp* et comportant une séquence ancre en 5' (Figure 15). Cette approche permet de s'affranchir du signal aspécifique dû à l'auto-amorçage lors de la RT (Landry et al. 2007; Barbeau, Mesnard 2015). En utilisant une approche de RT-qPCR nichée, une étude parue cette année a également rapporté la présence de transcrits d'*asp* dans les T CD4+ de patients sous ART et de patients non traités (Mancarella et al. 2019). Dans cette étude en revanche, les transcrits d'*asp* ont uniquement été détectés lorsque les T CD4+ étaient réactivés *ex vivo*. Leur RT a été effectuée à l'aide d'une amorce complémentaire d'une région du transcrit située 400 nucléotides en aval du codon stop d'*asp*, et la PCR nichée à l'aide de deux paires d'amorces : une paire d'amorces "universelle" qui s'hybride de part et d'autre de l'ORF d'*asp*, puis une paire d'amorces spécifique à chaque patient qui s'hybride dans l'ORF d'*asp*. L'absence de détection de transcrits d'*asp* dans les T CD4+ de patients non réactivés est surprenante car la sensibilité de la qPCR nichée est *à priori* supérieure à celle de la qPCR classique utilisée dans mon étude et celle de Zapata et al. En revanche, la quantification de la qPCR nichée est moins précise que la quantification de la qPCR classique.

Quatre principaux transcrits d'*asp* de longueurs différentes ont été décrits *in vitro* dans des modèles cellulaires distincts (Michael et al. 1994; Landry et al. 2007; Kobayashi-Ishihara et al. 2012; Saayman et al. 2014), mais l'expression de ces différents transcrits *in vivo* n'a jamais été

démontrée. Il est donc possible que les cellules infectées *in vivo* expriment différents transcrits d'*asp*, et que la nature des transcrits exprimés diffère en fonction du type cellulaire et en fonction du stade d'infection de la cellule. Deux des transcrits antisens du VIH-1 décrits *in vitro* exercent une fonction de régulation de la transcription virale sens (Kobayashi-Ishihara et al. 2012; Saayman et al. 2014; Zapata et al. 2017). Bien qu'il ait été suggéré que ces deux transcrits soient non codants, les 4 transcrits antisens potentiels possèdent l'ORF d'*asp*. Dans l'étude menée par Mancarella et al, le traitement des T CD4+ avec un inhibiteur de la polymérase II réduit le signal obtenu par RT-qPCR, ce qui suggère que les transcrits d'*asp* détectés dans cette étude sont codants.

Malgré cette information, la nature des transcrits détectés dans cette étude reste inconnue, de même que la nature des transcrits détectés dans mon étude et dans l'étude de Zapata et al. Il est donc possible que différents transcrits d'*asp* aient été détectés dans nos 3 études. Cette hypothèse est probable car, contrairement à mon amorce de RT et à celle utilisée par Zapata et al, l'amorce de RT de Mancarella et al ne permet pas de détecter les transcrits courts d'*asp*. L'absence de transcrits d'*asp* dans les T CD4+ non réactivés pourrait alors indiquer que ces cellules produisent des transcrits courts d'*asp*. A l'avenir, il serait intéressant d'analyser l'expression des transcrits d'*asp* dans des T CD4+ de patients réactivés *ex vivo* en utilisant mon amorce de RT qui cible une région conservée de l'ORF d'*asp* (Figure 43A), et qui permet donc théoriquement de détecter tous les transcrits antisens qui présentent l'ORF d'*asp*.

Dans l'étude de Mancarella et al, *asp* et *env* présentent des profils d'expression similaires dans les T CD4+ réactivés, ce qui est en contraste avec l'antagonisme des transcriptions sens et antisens du VIH-1 qui a précédemment été décrite (Kobayashi-Ishihara et al. 2012; Laverdure et al. 2012; Arpin-André et al. 2014). Deux autres études ont récemment suggéré que les transcriptions sens et antisens du VIH-1 puissent être simultanément actives dans les cellules infectées (Kobayashi-Ishihara et al. 2018; Affram et al. 2019). Affram et al ont détecté ASP dans des lignées cellulaires chroniquement infectées après ré-activation de la voie NK-kB, et Kobayashi et al ont détecté la transcription du VIH-1 dans les deux sens dans une lignée cellulaire infectée *in vitro*. Cependant, les résultats obtenus par Mancarella et al ne permettent pas de déterminer si les transcrits sens et antisens du VIH-1 détectés par RT-qPCR sont exprimés simultanément dans les mêmes cellules. Auparavant, notre équipe avait rapporté que les transcriptions sens et antisens du VIH-1 n'avaient pas lieu dans les mêmes cellules (Laverdure et al. 2012).

Les mécanismes moléculaires et cellulaires qui régulent l'équilibre entre les transcriptions sens et antisens du VIH-1 sont complexes. Dans mon étude, l'activation de la voie NF- κ B dans 2 lignées infectées de manière latente résulte en une augmentation de la transcription virale dans les deux sens, en accord avec les résultats de précédentes études (Michael et al. 1994; Vanhée-Brossollet et al. 1995; Peeters et al. 1996; Kobayashi-Ishihara et al. 2012; Arpin-André et al. 2014). Cependant, le ratio des transcriptions sens/antisens augmente suite à l'activation des cellules, ce qui peut indiquer que les facteurs de transcription dont l'expression est induite activent préférentiellement la transcription sens. Cette observation confirme que la transcription antisens du VIH-1 est inhibée par la transcription sens, et confirme la pertinence de son étude dans des cellules qui expriment naturellement peu de transcrits sens du VIH-1 telles que les DC, les macrophages et les T CD4+ infectés de manière latente.

Dans tous les cas, la détection de transcrits d'*asp* dans les cellules de patients indiquent que **le gène *asp* s'exprime au cours de l'infection**. Plus particulièrement, la détection des transcrits d'*asp* dans les T CD4+ de patients non réactivés et réactivés *ex vivo* suggère que le gène *asp* peut s'exprimer dans des cellules infectées de manière latente et dans des cellules infectées de manière productive. A l'avenir, il serait intéressant de comparer le niveau d'expression des transcrits antisens du VIH-1 dans les cellules infectées de manière productive et dans les cellules infectées de manière latente d'un même patient. L'analyse de l'expression des transcrits antisens du VIH-1 pourrait également être élargie à d'autres populations cellulaires présentant une faible activité transcriptionnelle sens, telles que les DC et les macrophages (Laverdure et al. 2012). Un projet de recherche visant à étudier l'expression des transcrits d'*asp* dans les cellules infectées de manière latente est en cours de réalisation au sein de l'équipe. Ce projet de recherche s'inscrit dans l'étude de l'emploi potentiel d'ASP comme biomarqueur pour le suivi de l'infection par le VIH-1 qui a fait l'objet du dépôt d'un brevet auprès du CNRS.

II. Détection d'anticorps anti-ASP chez le patient

1. Fréquence de patients présentant des anticorps anti-ASP

A l'aide du LIPS, j'ai détecté des anticorps anti-ASP dans le plasma d'environ 15% des patientes du Burkina Faso (3 sur 19), et dans le plasma d'environ 10% des patients français de

la cohorte ANRS SEROCO (1 sur 10). Mes résultats **rapportent qu'au moins une fraction des patients développe une réponse anticorps anti-ASP au cours de leur infection**, ce qui avait été pour la première fois suggéré en 1995 (Vanhée-Brossollet et al. 1995). Ces résultats apportent également des preuves supplémentaires quant à **l'existence d'ASP et à son immunogénicité *in vivo***, en accord avec la détection de T CD8+ cytotoxiques dirigés contre des peptides d'ASP chez le patient (Berger et al. 2015; Bet et al. 2015). Il est intéressant de noter que la fréquence de patients détectés positifs pour les anticorps anti-ASP avec le LIPS est dans le même ordre de grandeur que la fréquence de patients infectés par HTLV-1 qui présentent des anticorps anti-HBZ (Enose-Akahata et al. 2013; Shiohama et al. 2016), et que la fréquence de patients infectés par le VIH-1 qui présentent des anticorps contre les protéines Tat (Rezza et al. 2005), Vif (O'Neil et al. 1997), Vpr et Vpu (Reiss et al. 1990).

En utilisant des billes recouvertes de protéines A/G qui lient préférentiellement le fragment Fc des IgG, j'ai probablement détecté des IgG anti-ASP dans le plasma des patients. Bien que les IgG constituent l'isotype majoritaire du plasma et soient les principaux contributeurs des réponses humorales ciblant les protéines Gag, Pol et Env du VIH-1 (Tomaras et Haynes 2009), il n'est pas à exclure que les patients présentent d'autres isotypes d'anticorps anti-ASP dans leur plasma. En particulier, il est possible que des IgM anti-ASP soient présents lors de la mise en place de la réponse anticorps anti-ASP chez les patients. Il serait donc intéressant de rechercher la présence d'IgM anti-ASP chez les patients #7 et #40 pour lesquels la réponse anticorps anti-ASP est devenue détectable au cours du suivi clinique. La détection quasi-exclusive d'IgG anti-ASP par le LIPS a potentiellement sous-estimé l'intensité de la réponse anticorps anti-ASP de certains patients, et par conséquent la fréquence de patients présentant des anticorps anti-ASP.

Deux autres facteurs peuvent également avoir contribué à sous-estimer la fréquence de patients qui présentent des anticorps anti-ASP dans mon étude : l'utilisation d'un antigène d'ASP dont la séquence n'a peut-être pas permis de détecter les anticorps dirigés contre les régions V5 et V4 d'ASP spécifiques à chaque patient, et le niveau basal de luminescence associé à nano-ASP. Je reviendrai sur ces deux points dans les perspectives.

2. Epitope d'ASP ciblé par les anticorps *in vivo*

J'ai détecté des anticorps anti-ASP dans le plasma de 3 patientes du Burkina Faso (patientes #7, #9 et #16) et dans le plasma d'un patient français (patient #40). Au Burkina Faso, le CRF06_cpx, le CRF02_AG, le sous-type A et le sous-type G sont respectivement responsables d'environ 54, 38, 3 et 1% des infections (Nadembega et al. 2006; Kagone et al. 2011; Sagna et al. 2015; Ngo-Giang-Huong et al. 2019). En France, comme dans le reste de l'Europe occidentale, le sous-type B prédomine largement (Hemelaar et al. 2019). La détection d'anticorps anti-ASP à des fréquences peu différentes chez ces patients *à priori* infectés par des sous-types et CRF différents suggérait l'existence d'un ou plusieurs épitopes conservés chez ASP. En effet, chez les patients #7, #9, #16 et #40, les anticorps semblent cibler **un ou plusieurs épitopes localisés entre les résidus 26 et 141 d'ASP**. Le motif PxxP très conservé et la zone centrale d'ASP comprenant V5 semblent être nécessaires à la reconnaissance de cet épitope par les anticorps. Cependant, mes résultats ne me permettent pas de déterminer si ces deux motifs sont inclus dans l'épitope d'ASP ou contribuent indirectement à cet épitope en favorisant le repliement de la protéine. La contribution des motifs PxxP et V5 à l'épitope d'ASP pourra être analysée plus finement en réalisant des versions d'ASP spécifiquement mutées de ces deux motifs.

La région 141-189 d'ASP qui comprend le motif hypervariable V4 et la région 1-26 d'ASP qui comprend les deux triplets de cystéine ne semblent pas être reconnus par les anticorps des patients. La séquence de V4 est différente chez chaque patient. Il est donc possible que des anticorps ciblent cette région *in vivo*, mais que l'utilisation dans le LIPS d'un antigène d'ASP dont la séquence diffère de celle retrouvée chez les patients n'ait pas permis de détecter les anticorps anti-V4.

Le ciblage d'un ou plusieurs épitopes localisés entre les résidus 26 et 141 d'ASP suggère que la région 26-141 d'ASP est exposée au système immunitaire au cours de l'infection. Dans la forme transmembranaire d'ASP, cette région pourrait se trouver exposée au milieu extracellulaire. Dans la forme nucléaire d'ASP, cette région pourrait être exposée lors de la lyse des cellules infectées. La localisation d'ASP dans des cellules infectées *in vivo* n'a jamais été décrite, mais les études réalisées dans des modèles cellulaires *in vitro* suggèrent qu'au moins une fraction des cellules infectées exprime ASP sous forme nucléaire, ce qui pourrait en partie expliquer la faible fréquence de patients qui présentent une réponse anticorps anti-ASP. Dans

tous les cas, la structure tertiaire d'ASP nucléaire diffère probablement de celle d'ASP transmembranaire.

Les anticorps ciblant la région N-terminale 1-62 d'ASP n'ont été détectés que chez la patiente #16, alors que cette région d'ASP est très conservée. La présence d'anticorps dirigés contre la région N-terminale d'ASP peut indiquer sa plus forte exposition au système immunitaire chez cette patiente, soit du fait de la forte expression d'ASP à la surface des cellules infectées, soit du fait de l'importante lyse de ces cellules. Cette dernière hypothèse est probable étant donné que la patiente #16 est la seule des 4 patients positifs dont le taux de T CD4+ augmente au cours du suivi. La patiente #16 présentant le plus fort titre d'anticorps anti-ASP, la détection unique d'anticorps dirigés contre l'extrémité N-terminale d'ASP chez cette patiente peut également refléter sa forte concentration globale en anticorps anti-ASP.

3. Profil d'expression d'ASP au cours de l'infection

La détection de T CD8+ cytotoxiques dirigés contre plusieurs peptides chevauchants d'ASP parmi les PBMC de patients infectés en phase chronique (Berger et al. 2015; Bet et al. 2015), et la détection d'anticorps anti-ASP dans les séra de patients (Vanhée-Brossollet et al. 1995) ont précédemment suggéré qu'ASP était exprimée à différentes phases de l'infection par le VIH-1. Récemment, une étude a rapporté l'expression d'ASP dans des cellules chroniquement infectées qui étaient soit faiblement, soit fortement productrices de virions (Affram et al. 2019). Cette étude est en accord avec les deux études mentionnées précédemment qui ont suggéré l'expression de la transcription antisens du VIH-1 dans des cellules qui expriment également des transcrits sens (Kobayashi-Ishihara et al. 2018; Mancarella et al. 2019), et suggère qu'ASP peut être produite à différents stades de l'infection. En admettant que la présence d'anticorps anti-ASP *in vivo* reflète la production d'ASP, le suivi de l'évolution de la réponse anticorps anti-ASP chez les patients peut apporter des éléments de réponse relatifs à la temporalité de l'expression d'ASP *in vivo*.

Chez les patients #7, #9, #16 et 40, l'intensité de la réponse anticorps anti-ASP a fluctué au cours du temps, avec des variations plus ou moins importantes d'un patient à l'autre. Ces variations peuvent indiquer soit (i) la fluctuation de la production d'ASP par les cellules au cours de l'infection, soit (ii) la fluctuation de l'exposition d'ASP au système immunitaire. Des variations dans l'exposition d'ASP pourraient être induites par un changement de sa localisation

dans les cellules infectées, ou encore par sa quantité plus importante dans le milieu extracellulaire, due par exemple à une augmentation de la lyse des cellules infectées par le système immunitaire.

Patient #40 de la cohorte SEROCO

Le patient #40 a été inclus dans la cohorte SEROCO au plus tard un an après sa date d'infection présumée. Ce patient présentait un signal légèrement inférieur au seuil de positivité lors de son inclusion, ce qui suggère qu'une réponse anticorps anti-ASP a été mise en place lors de la première année de son infection. Néanmoins, le pic d'anticorps anti-ASP chez ce patient a été détecté 2.5 années après son inclusion. ASP pourrait donc être exprimée à des stades précoces et plus avancés de l'infection. Le pic transitoire d'anticorps anti-ASP détecté 2.5 années post-inclusion chez ce patient pourrait indiquer une augmentation transitoire de l'expression d'ASP par les cellules infectées, ou une augmentation transitoire de son exposition au système immunitaire.

Patientes #7, #9 et #16 de l'étude clinique PROMISE-PEP

La date d'infection des patientes #7, #9 et #16 étant inconnue, aucune hypothèse relative à la temporalité de l'expression d'ASP chez ces patientes ne peut être émise. Cependant, le fort titre d'anticorps anti-ASP et la présence d'anticorps ciblant l'extrémité N-terminale d'ASP chez la patiente #16 peuvent suggérer que son infection est plus ancienne que celle des patientes #7 et #9. Chez les patientes #9 et #16, la détection de la réponse anticorps anti-ASP dès S0 suggère que l'expression d'ASP était antérieure à l'arrêt de la prise d'ARV chez ces patientes. Pour la patiente #7, il est impossible de déterminer si la détection des anticorps anti-ASP à S25 reflète la première apparition de la réponse anticorps anti-ASP chez cette patiente, ou reflète juste l'une des fluctuations de l'intensité de la réponse anticorps anti-ASP au cours du temps.

L'étude de l'évolution des anticorps anti-ASP au cours du temps chez les patients #7, #9, #16 et #40 ne permet pas de déterminer les stades de l'infection auxquelles ASP est préférentiellement exprimée, mais le profil du patient #40 suggère qu'ASP puisse être exprimée aux stades précoces et plus avancés de la pathologie.

4. Réponse anticorps anti-ASP et CV plasmatique

Les paramètres immuno-virologiques qui influent sur la fluctuation de la réponse anticorps anti-ASP restent à être déterminés. Le faible nombre de patients étudiés ne m'a pas permis d'étudier la corrélation entre la réponse anticorps anti-ASP et la CV des patients. Néanmoins, le suivi de la réponse anticorps anti-ASP et de la CV au cours du temps chez les patients #7, #9, #16 et #40 m'a permis d'élaborer des hypothèses sur l'existence d'un lien potentiel entre ces deux paramètres.

J'ai détecté des anticorps anti-ASP chez 4 patients qui appartenaient au groupe de patientes du Burkina Faso (patientes #7, #9 et #16) et au groupe de patients non traités de la cohorte SEROCO (patient #40). En revanche, je n'ai détecté d'anticorps anti-ASP ni chez les patients sous ART, ni chez les patients *controllers* que j'ai analysés. Du fait de la faible fréquence de patients présentant une réponse anticorps anti-ASP, je ne peux pas totalement exclure la possibilité que cette absence de détection soit due au petit nombre de patients sous ART (n=20) et *controllers* (n=20) étudiés. Dans tous les cas, mes résultats suggèrent que les paramètres immuno-virologiques des patients sous ART et des patients *controllers* ne sont pas favorables au développement ou au maintien de la réponse anticorps anti-ASP. Malgré la complexité des paramètres immunologiques et virologiques qui caractérisent les patients sous ART et les patients *controllers*, ces deux groupes de patients ont une caractéristique commune : une faible réplication virale, qui se traduit par une CV très faible (patients *controllers*) ou indétectable (patients sous ART). L'absence d'anticorps anti-ASP chez ces patients suggère donc qu'une phase de faible réplication virale prolongée nuit au développement ou au maintien de la réponse anticorps anti-ASP.

Un fort déclin des réponses anticorps dirigées contre les protéines Gag, Pol et Env du VIH-1 a été observé suite à l'initiation de l'ART (Voltersvik et al. 2003; Killian et al. 2006; Zhang et al. 2017; Delagreverie et al. 2019). Le déclin de ces réponses anticorps a été associé à la diminution de la CV induite par l'ART, et donc à la diminution de la production des antigènes viraux nécessaires au maintien de ces réponses anticorps (Killian et al. 2006; French et al. 2017). De manière analogue, l'absence d'anticorps anti-ASP chez les patients sous ART pourrait indiquer qu'une diminution de la production d'ASP est associée au déclin de la CV. Cette hypothèse suggérerait alors qu'ASP est produite au cours du cycle viral, et serait en accord avec l'étude d'Affram et al (Affram et al. 2019). L'absence d'anticorps anti-ASP chez les patients *controllers* peut également indiquer que le contrôle précoce de la réplication virale a

altéré le développement d'une réponse anticorps anti-ASP chez ces patients. Cette hypothèse a déjà été avancée pour expliquer le faible taux d'anticorps neutralisants retrouvé chez les individus qui contrôlent spontanément la réplication virale (Lambotte et al. 2009).

Lorsque la réplication virale est efficacement contrôlée, les cellules infectées de manière latente prévalent sur les cellules productrices de virus. Plusieurs études ont suggéré que la transcription antisens du VIH-1 était préférentiellement active dans les cellules qui présentent une faible transcription sens, telles que les cellules infectées de manière latente (Zapata et al. 2017; Kobayashi-Ishihara et al. 2018; Affram et al. 2019). Néanmoins, l'absence d'anticorps anti-ASP dans le plasma des patients sous ART et des patients *controllers* semble indiquer que le faible niveau de l'activité transcriptionnelle sens du VIH-1 n'est pas le seul prérequis à l'expression d'ASP. Il est également possible qu'ASP soit produite par les cellules infectées de manière latente, mais que sa localisation dans ces cellules ne favorise pas le développement d'une réponse immunitaire. Cette hypothèse serait en accord avec l'étude d'Affram et al qui a rapporté la localisation nucléaire d'ASP dans des cellules chroniquement infectées (Affram et al. 2019).

Si les résultats obtenus des patients sous ART et des patients *controllers* vont dans le même sens, les profils des patients #7, #9, #16 et #40 suggèrent que les liens qui unissent la réplication virale, l'expression d'ASP et la réponse anticorps anti-ASP sont complexes :

- **La patiente #16** présente un fort titre d'anticorps anti-ASP et une faible CV au cours du suivi. Bien que son titre d'anticorps reste élevé, sa réponse anticorps anti-ASP décline de moitié entre S0 et S37. Comme pour les patients sous ART et les patients *controllers*, il est possible que le déclin de la réponse anticorps anti-ASP soit dû à un faible niveau de réplication virale.
- **La patiente #9** présente une CV et un taux d'anticorps anti-ASP stables entre S0 et S37. Ce profil peut indiquer qu'une réplication virale constante contribue à maintenir la réponse anticorps anti-ASP, ce qui est favorable de l'expression d'ASP au cours du cycle viral.
- **Les patients #7 et #40** présentent un pic d'anticorps anti-ASP au cours du suivi. Pour les deux patients, ce pic apparaît lors d'une phase de déclin de la CV. Les profils des patients #7 et #40 peuvent indiquer qu'une phase de faible réplication virale favorise le développement d'anticorps anti-ASP. Le développement d'anticorps anti-ASP pourrait être favorisé par une forte production ou une forte exposition d'ASP lors de la phase de déclin de la CV, ce qui suggérerait qu'ASP soit produite par des cellules infectées de manière

latente. Cette hypothèse serait en apparence contradiction avec les profils des patients sous ART et des patients *controllers*. Le développement de la réponse anticorps anti-ASP chez les patients #7 et #40 pourrait également être favorisé par la restauration d'un équilibre entre le système immunitaire et la réplication virale.

La grande diversité des profils de la réponse anticorps anti-ASP et de la CV chez les différents patients étudiés ne m'a pas permis d'élaborer une hypothèse consensus pour expliquer l'évolution de ces deux paramètres au cours du temps. En effet, mes résultats suggèrent que l'évolution de la CV et de la réponse anticorps anti-ASP est régie par un ensemble de paramètres complexes que l'étude d'un petit nombre de patients ne me permet pas d'appréhender. En outre, il n'est pas possible de déterminer la nature de la relation causale qui lie potentiellement la CV à la réponse anticorps anti-ASP. Ainsi, les profils des patients #7, #16 et #40 peuvent indiquer qu'une phase de faible réplication virale favorise le développement d'anticorps anti-ASP, ou bien que la réponse anticorps anti-ASP contribue au maintien de la réplication virale. Néanmoins, le profil des différents patients analysés suggère que la réponse anticorps anti-ASP dépend en partie de la production d'antigènes au cours de la réplication virale, comme cela a été décrit pour les autres protéines virales du VIH-1.

5. Réponse anticorps anti-ASP dans le lait maternel

J'ai détecté des signaux indiquant la présence potentielle d'anticorps anti-ASP dans le lait maternel de deux patientes (patientes #9 et #16). Bien que préliminaires, **ces résultats constituent le premier rapport suggérant la présence d'anticorps anti-ASP dans le lait maternel de patientes infectées.**

En utilisant des billes couplées aux protéines A/G, j'ai principalement détecté des IgG anti-ASP dans le lait maternel des patientes, alors que les IgA constituent l'isotype majoritaire du lait maternel (Van de Perre 2003; Wheeler et al. 2007). Il serait donc intéressant d'analyser la présence d'IgA anti-ASP dans le lait maternel des patientes #9 et #16, mais également dans le lait maternel de la patiente #7 qui ne semble pas présenter d'IgG anti-ASP dans son lait. Pour la patiente #7 dont les anticorps anti-ASP plasmatiques sont devenus détectables au cours du suivi clinique, il serait également intéressant d'analyser la présence d'IgM anti-ASP dans le lait maternel. Afin de détecter des IgA et des IgM anti-ASP, des protéines L capables de lier tous

les isotypes d'anticorps porteurs d'une chaîne légère kappa pourraient être utilisées à la place des protéines A/G dans le LIPS.

Les IgG du lait maternel proviennent principalement du transfert des IgG plasmatiques à travers la barrière épithéliale mammaire. Pour la patiente #16, le déclin du signal observé entre S0 et S37 dans le plasma comme dans le lait maternel serait en accord avec l'origine plasmatique des anticorps anti-ASP du lait. De plus, la patiente #16 présente les plus forts titres d'anticorps anti-ASP qui ont été observés dans le plasma et dans le lait maternel, ce qui suggère également que les signaux détectés dans ces deux fluides corporels sont positivement associés. Enfin, la concentration en IgG du lait maternel est inférieure de 2 logs à celle du plasma (Van de Perre 2003; Wheeler et al. 2007), ce qui peut expliquer que les signaux détectés dans le lait maternel des patientes #9 et #16 soit plus faible que les signaux détectés dans leur plasma. L'absence de signaux dans le lait maternel de la patiente #7 peut indiquer que la concentration en anticorps anti-ASP est trop faible pour être détectée, ou encore que cette patiente présente d'autres isotypes d'anticorps anti-ASP dans son lait maternel.

Contrairement aux IgG, le taux d'IgA et d'IgM anti-Env dans le lait maternel a été associé à une diminution du risque de transmission du virus de la mère à l'enfant. Il serait intéressant d'analyser l'éventuelle contribution des anticorps anti-ASP du lait maternel à la prévention de la transmission mère-enfant, mais cette étude nécessiterait l'étude d'un grand nombre de patientes et de nouveaux-nés, idéalement non traités.

Conclusion et Perspectives

Au cours de l'infection par le VIH-1, le gène *asp* produit des transcrits et une protéine immunogène qui induit une réponse anticorps dans au moins une fraction des patients infectés. Ces anticorps ciblent *à priori* un ou plusieurs épitopes conservés d'ASP qui comprennent probablement les motifs PxxP et V5 d'ASP. ASP étant potentiellement exprimée à la membrane plasmique des cellules infectées et à la surface des particules virales, la réponse anticorps anti-ASP pourrait contribuer au contrôle de la réplication virale en neutralisant les particules virales ou en induisant la lyse des cellules infectées par les mécanismes d'ADCC, d'ADCP ou de CDC.

Les transcrits d'*asp* ont été détectés dans les T CD4+ totaux de 2 patients, et les anticorps anti-ASP dans le plasma de 4 patients (#7, #9, #16 et #40). Deux patientes (#9 et #16) présentent potentiellement des anticorps anti-ASP dans leur lait maternel. Bien que l'étude de ces 4 patients positifs ne soit pas suffisante pour analyser la corrélation éventuelle entre la réponse anticorps anti-ASP et la charge virale plasmatique, l'absence d'anticorps anti-ASP chez les patients sous ART et chez les patients *controllers* indiquent que la réponse anticorps anti-ASP n'est pas une composante majeure du contrôle de la réplication virale chez ces patients. Toutefois, l'apparition d'un pic d'anticorps anti-ASP lors d'une phase de déclin de la virémie chez 2 patients (#7 et #40), ainsi que la faible virémie et le fort titre d'anticorps anti-ASP de la patiente #16 interrogent sur un éventuel impact de la réponse anticorps anti-ASP sur la réplication virale. Il serait également intéressant d'analyser la charge virale du lait maternel des patientes #9 et #16 qui présentent des anticorps anti-ASP, bien que l'analyse de la corrélation entre ces deux paramètres dans le lait maternel nécessite l'étude d'un plus grand nombre de patientes, idéalement non traitées.

L'analyse de l'impact éventuel des anticorps anti-ASP sur la réplication virale, et plus globalement sur l'évolution de la maladie, nécessiterait d'étudier la progression naturelle de la maladie chez des patients qui présentent des anticorps anti-ASP. Une telle étude serait cependant difficile étant donné que la fréquence de patients présentant des anticorps anti-ASP semble être faible (10 à 15%), et que les échantillons de plasma d'individus non traités sont rares. Néanmoins, la détermination de la fonctionnalité (neutralisation, ADCC...) et des isotypes des anticorps anti-ASP présents dans le plasma des patients #7, #9, #16 et #40 et dans le lait maternel des patientes #9 et #16 pourrait permettre d'apporter des éléments de réponse supplémentaires quant au lien existant entre la réponse anticorps anti-ASP et la réplication virale.

A l'avenir, deux approches pourraient être envisagées pour améliorer la détection qualitative et quantitative des anticorps anti-ASP par la technique LIPS (Figure 46). Une première approche consisterait à utiliser un **antigène d'ASP spécifique** à la séquence des virus de chaque patient. En effet, la réponse anticorps qui cible les régions hypervariables V5 et V4 d'ASP a probablement été sous-estimée dans mon étude par l'utilisation d'un antigène d'ASP dont la séquence diffère de celle retrouvée chez les patients. Cette approche de LIPS spécifique à chaque patient supposerait le séquençage préalable du gène *asp* des provirus des patients, et permettrait d'analyser la réponse anticorps anti-ASP polyclonale dans sa globalité. Le suivi de la variation des épitopes d'ASP ciblés par la réponse anticorps des patients au cours du temps permettrait également de suivre l'échappement de leur virus au système immunitaire.

A l'inverse, une deuxième approche consisterait à exploiter la conservation des épitopes d'ASP pour concevoir un **antigène d'ASP minimal et "universel"**, qui permettrait de conserver le pouvoir immunogène d'ASP tout en minimisant son bruit de fond (Figure 46). Dans cette optique, le séquençage du gène *asp* des provirus des patients qui présentent des anticorps anti-ASP pourrait être envisagé afin d'identifier d'éventuelles signature génomiques prédictives de l'immunogénicité d'ASP. En choisissant le mutant d'ASP qui présente le meilleur rapport signal/bruit, cette approche pourrait permettre de détecter des réponses anticorps anti-ASP de plus faible intensité.

Concernant l'étude des transcrits d'*asp*, un projet de valorisation est actuellement en cours au sein de l'équipe. Ce projet vise à approfondir l'étude de l'expression des transcrits d'*asp* dans les cellules infectées de manière latente, et à déterminer si la transcription antisens est un trait commun aux cellules latentes porteuses d'un provirus fonctionnel.

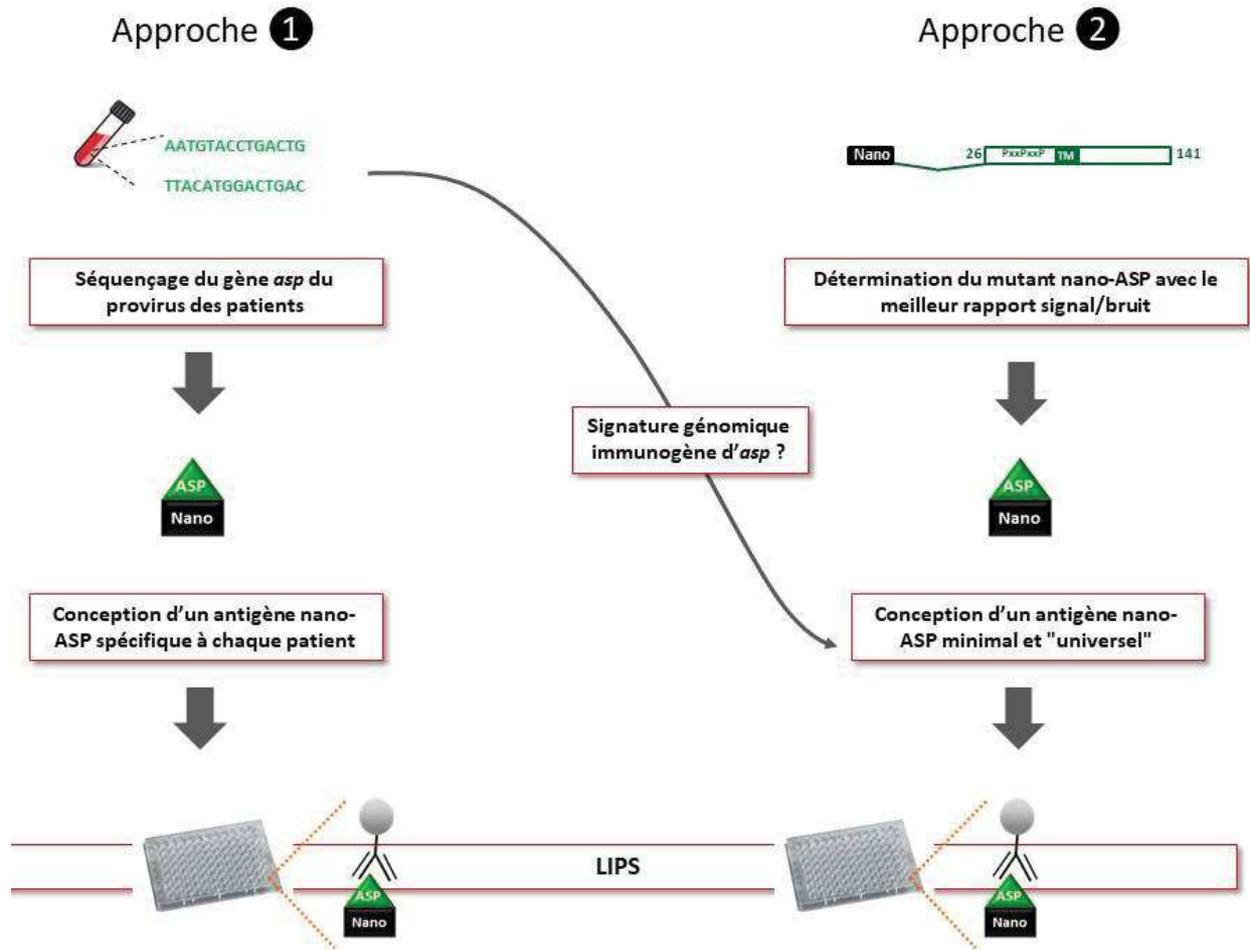


Figure 46 : Les deux approches envisagées pour améliorer la détection qualitative et quantitative des anticorps anti-ASP chez les patients.

J'ai particulièrement apprécié le côté translationnel de mon projet de thèse, et le décloisonnement partiel des connaissances appliquées et fondamentales qu'il a nécessité. L'étude de la réponse anticorps anti-ASP a répondu à l'exigence initiale du projet, à savoir la confirmation de l'expression d'ASP *in vivo*. Cependant, il est dommage que je n'aie eu accès qu'à un petit nombre d'échantillons de patients, car les résultats que j'ai obtenus soulèvent plusieurs questions qui resteront sans réponses, en partie faute d'un nombre suffisant d'échantillons pour réaliser des études statistiques : A quel stade de l'infection ASP est elle exprimée ? La réponse anticorps anti-ASP est elle associée à une évolution clinique favorable ? Le ciblage de certains épitopes d'ASP (région N-terminale) a-t-il des conséquences fonctionnelles ? Quels paramètres influent sur le développement et le maintien de la réponse anticorps anti-ASP ?

Malgré ces questionnements, j'espère que mes résultats apporteront des compléments d'informations qui aideront à mieux comprendre le rôle exercé par ASP dans l'infection par le VIH-1.

Matériel et Méthodes

I. Culture cellulaire

1. Lignées cellulaires

a. Cellules eucaryotes et transfections

Toutes les cultures cellulaires ont été réalisées à 37°C dans une atmosphère à 5% de CO₂. Les milieux de culture complets contenaient 10% de SVF (décomplémenté 30 minutes à 56°C), et 100 µg/mL de pénicilline et de streptomycine.

Les HEK 293T ont été cultivées dans du milieu DMEM (Life technologies) complet. Les cellules ont été diluées au 1/5 tous les deux jours et maintenues en culture pendant 20 passages. Les HEK 293T ont été transfectées en plaque 6 puits avec les constructions suivantes : p-CAGGS vide (contrôle négatif) p-CAGGS-nanoluciférase (nano), p-CAGGS-ASP, p-CAGGS-nano-ASP et p-CAGGS-nano-ΔASP (mutants de nano-ASP). La transfection a été réalisée en ajoutant 3 µg de plasmide d'expression et 9 µg de Polyéthylèneimine (Polysciences Inc.) par puits. Après 6h d'incubation, le milieu de culture a été renouvelé. Les cellules ont été lysées 48h post-transfection.

Les lignées U1 et ACH-2 sont respectivement des cellules pré-monocytaires et lymphoïde infectées de manière latente par le VIH-1 (Folks et al. 1987, 1989; Clouse et al. 1989). Les cellules U1 et ACH-2 ont été cultivées dans du milieu RPMI complet. Les cellules ont été diluées au 1/10^e tous les deux jours. Les cellules U1 ont été activées en ajoutant du TNF-α dans le milieu de culture pendant 4h (2 ng/mL). Les cellules ACH-2 ont été activées en ajoutant de la PMA (15 ng/mL) et de la ionomycine (250 ng/mL) dans le milieu de culture pendant 4h.

b. Cellules procaryotes et transformation

Les bactéries utilisées pour la production de plasmides d'expression sont des DH5α électro-compétentes. Il s'agit d'une souche d'*Escherichia coli* utilisée en routine pour le clonage et l'amplification de plasmides (Taylor et al. 1993). Les bactéries sont cultivées à 37°C dans du milieu LB supplémenté d'ampicilline (50 µg/mL final) sous agitation à 180 rpm (rotation par minute).

2. Cellules primaires

Dans le cadre de notre collaboration avec le Dr Tuillon du CHU de Montpellier, nous avons travaillé à partir de tubes de sang total (4 à 7 mL) de patients français infectés par le VIH-1 et sous ART (**voir IV Description des cohortes de patients et considérations éthiques**). J'ai suivi les étapes suivantes pour l'isolation des T CD4⁺ totaux des patients :

- 1.** Le sang total a été centrifugé 10 min à 500 g à température ambiante pour isoler le plasma. Le plasma obtenu a ensuite été de nouveau centrifugé 10 min à 500g, puis conservé à -80°C **pour l'analyse ultérieure de la présence d'anticorps anti-ASP.**
- 2.** Le culot cellulaire de sang total obtenu a été repris dans un volume de PBS 1X identique au volume de plasma isolé, puis les lymphocytes T CD4⁺ totaux ont été isolés à l'aide du kit RosetteSep™ Human CD4⁺ T Cell Enrichment Cocktail (Stemcell). Brièvement, le culot cellulaire de sang total repris dans du PBS 1X a été incubé 20 min avec une combinaison d'anticorps tétramériques qui lient les hématies et les PBMC CD4⁻. Un volume équivalent de Ficoll (Lymphocyte separation medium, Eurobio) a ensuite été ajouté, puis le sang a été centrifugé 20 min à 1200g. Suite à cette centrifugation, les hématies et les PBMC CD4⁻ complexés par les anticorps se retrouvent dans le culot, tandis que les cellules enrichies en T CD4⁺ se retrouvent à l'interface entre le Ficoll et le plasma. Le protocole RosetteSep permet une sélection négative des lymphocytes T CD4⁺, ce qui prévient leur activation.
- 3.** Pour chaque patient, la pureté de la population de T CD4⁺ isolées a été analysée par cytométrie en flux à l'aide d'un anticorps anti-CD4 couplé à la phycoérythrine (clone MEM-241 ; Immunotools).
- 4.** Les T CD4⁺ totaux obtenus ont été congelés à -80°C puis analysés pour la présence de transcrits d'*asp*. Le nombre de T CD4⁺ totaux obtenus varie d'un patient à l'autre. Un minimum de 0,7.10⁶ cellules et un maximum de 3.10⁶ cellules ont été isolées.

II. Biologie moléculaire

1. Génération des séquences codantes de la nanoluciférase, de nano-ASP et des mutants nano- Δ ASP

a. Choix des séquences nucléotidiques à utiliser

L'ensemble des expériences de LIPS ont été réalisées en utilisant la nanoluciférase fusionnée à ASP. Pour ces travaux, j'ai utilisé une séquence codante d'ASP optimisée pour le biais d'usage de codons en cellules de mammifères, précédemment décrit dans l'étude de Torresilla et al. (Torresilla et al. 2013). Cette séquence a été optimisée à partir de la séquence codante d'ASP du clone moléculaire pNL4.3 qui a été conçu à partir de la séquence provirale d'un isolat du VIH-1 de sous-type B (Adachi et al. 1986). La séquence protéique d'ASP optimisée (ASP opt) est identique à la séquence d'ASP codée par les clones moléculaires pNL4.3 et HXB2 (Ratner et al. 1985). Au début du projet, notre choix s'est initialement porté sur l'utilisation d'une séquence ASPopt du fait de la difficulté à détecter la protéine codée par la séquence sauvage d'ASP (ASPwt) dans des cellules transfectées ou transduites. Par la suite, le choix d'un vecteur d'expression adapté a permis de détecter des quantités équivalentes d'ASPwt et d'ASPopt dans des cellules transfectées. J'ai cependant conservé l'utilisation de la séquence ASPopt pour produire l'antigène ASP pour la technique LIPS, afin de conserver le même biais d'usage de codon que la séquence codante de la protéine nanoluciférase (Hall et al. 2012) à laquelle elle est fusionnée. **Par la suite, le terme ASP fera uniquement référence à ASPopt.**

La séquence codante de la nanoluciférase (nano) a été généreusement fournie par Olivier Moncorgé (séquence obtenue auprès de Promega). Une séquence codant pour une étiquette Flag (DYKDDDDK) est présente en amont de la séquence codante de la nano. Les protéines nano fusionnées à ASP (nano-ASP) et aux mutants de délétion d'ASP (nano- Δ ASP) possèdent donc toutes une séquence Flag à leur extrémité N-terminale.

b. Mutants de nano-ASP générés

Plusieurs mutants de nano-ASP tronqués de différents domaines d'ASP ont été générés (**Figure 47**) :

- Le mutant nano-ASP **1-62** code uniquement pour les 62 premiers acides aminés d'ASP.
- Le mutant **1-141** code pour les 141 premiers acides aminés d'ASP.
- Le mutant **26-189** code pour les acides aminés 26 à 189 d'ASP.
- Le mutant **60-189** code pour les acides aminés 60 à 189 d'ASP.

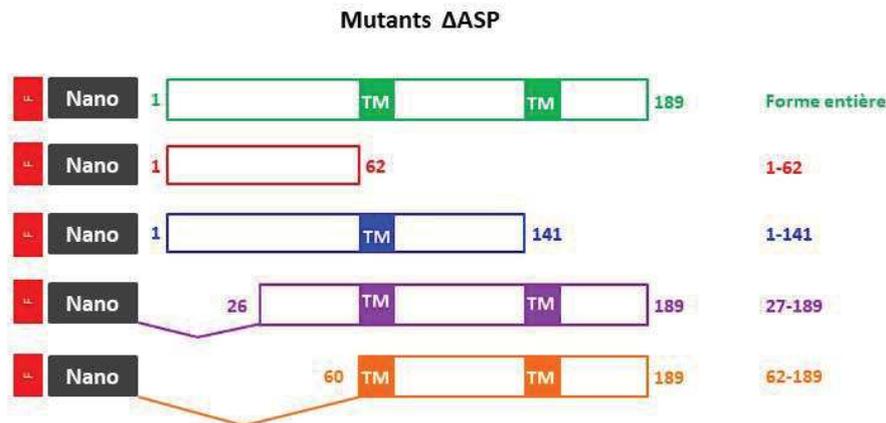


Figure 47 : Représentation schématique des différentes formes mutantes d'ASP (Δ ASP) fusionnées à la nanoluciférase (nano). Les acides aminés représentent la position relative des acides aminés dans la protéine. Chaque protéine de fusion présente une séquence Flag (F) à l'extrémité N-terminale de la nanoluciférase.

c. Génération des constructions p-CAG-nano, -nano-ASP et -nano- Δ ASP par clonage

Les séquences codant pour la nano, la nano-ASP et les mutants nano- Δ ASP ont été insérées par clonage dans le vecteur d'expression de mammifères p-CAGGS (Niwa et al. 1991). Dans ce plasmide, l'expression des séquences codantes est sous le contrôle du promoteur de la β -actine de poulet et de l'*enhancer* du CMV. Pour les protéines de fusion nano-ASP et nano- Δ ASP, les séquences codantes d'ASP et des différents mutants d'ASP décrits plus haut ont été clonées en 3' de la séquence codante de la nano, de sorte à ce que les différentes formes d'ASP soient exprimées fusionnées à l'extrémité C-terminale de la nanoluciférase. Les séquences codantes de nano-ASP et des mutants nano- Δ ASP ont été générées de la manière suivante :

1. Les séquences codantes de nano-ASP et des mutants nano- Δ ASP ont été amplifiées par PCR à partir de séquences matrices.

Les constructions p-CAG-nano-ASP, p-CAG nano-ASP **26-189** et p-CAG nano-ASP **60-189** ont été générées en réalisant une PCR "chevauchante" à partir des séquences codantes de

la nanoluciférase et d'ASP (séquence d'ASPOpt dérivée de HXB2). Le principe de la technique est décrit **Figure 48**. Dans un premier temps, les séquences codantes de la nano et d'ASP ont été amplifiées par PCR. L'amorce antisens utilisée pour amplifier la nanoluciférase est chevauchante de l'amorce sens utilisée pour amplifier ASP, ASP **26-189** ou ASP **60-189**. Les produits d'amplification de la nano obtenus sont complémentaires à leur extrémité 3' des produits d'amplification d'ASP, d'ASP **26-189** et d'ASP **60-189**. Une PCR chevauchante est alors réalisée sur les deux produits d'amplification, présents en quantité équivalente dans la réaction, en utilisant l'amorce sens utilisée pour amplifier la nano et l'amorce antisens utilisée pour amplifier ASP, ASP **26-189** ou ASP **60-189**. Les 10 premiers cycles d'amplification de la PCR chevauchante sont réalisés en l'absence d'amorce. Les amorces utilisées pour les suivantes (les séquences nécessaires à la réalisation de la PCR chevauchante sont soulignées) :

- Génération de la séquence codante nano-ASP à partir des ORF nano et ASP (PCR chevauchante) :
 - **Amplification de la nano** : amorces **sens** 5'-A CGT GAA TTC GCC GCC ATG GAC TAC AAG GAC GAC GAT GAC AAG GTC TTC ACA CTC GAA G-3' et **antisens** 5'-CAC GGA ATT CAG CTC GAG CCG CTG GAG CCC GCC AGA ATG CGT TC-3'.
 - **Amplification d'ASP** : amorces **sens** 5'-GAA CGC ATT CTG GCG GGC TCC AGC GGC TCG AGT CCC CAG ACC GTG AG-3' et **antisens** 5'-ACT GCG AAT TCA CTG CAG CTC CAC GCA GGA GTT CAG CAG CAC CTG ATT CAG CAG TGA-3'
 - **Amplification de nano-ASP à partir des ORF nano et ASP (PCR chevauchante)** : amorces **sens** 5'-A CGT GAA TTC GCC GCC ATG GAC TAC AAG GAC GAC GAT GAC AAG GTC TTC ACA CTC GAA G-3' et **antisens** 5'-ACT GCG AAT TCA CTG CAG CTC CAC GCA GGA GTT CAG CAG CAC CTG ATT CAG CAG TGA-3'.

- Génération de la séquence codante nano-ASP **26-189** à partir des ORF nano et ASP (PCR chevauchante) :
 - **Amplification de la nano** : amorces **sens** 5'-A CGT GAA TTC GCC GCC ATG GAC TAC AAG GAC GAC GAT GAC AAG GTC TTC ACA CTC GAA G-3' et **antisens** 5'- GTT ATC GGG ACT CGA GCC GCT GGA GCC CGC CAG AAT GCG TTC-3'.

- **Amplification d'ASP** : amorces **sens** 5'- TCC AGC GGC TCG AGT CCC GAT AAC AAC TGC CTG -3' et **antisens** 5'-ACT GCG AAT TCA CTG CAG CTC CAC GCA GGA GTT CAG CAG CAC CTG ATT CAG CAG TGA-3'.
- **Amplification de nano-ASP 26-189 à partir des ORF nano et ASP (PCR chevauchante)** : amorces **sens** 5'-A CGT GAA TTC GCC GCC ATG GAC TAC AAG GAC GAC GAT GAC AAG GTC TTC ACA CTC GAA G-3' et **antisens** 5'-ACT GCG AAT TCA CTG CAG CTC CAC GCA GGA GTT CAG CAG CAC CTG ATT CAG CAG TGA-3'.
- Génération de la séquence codante nano-ASP **60-189** à partir des ORF nano et ASP (PCR chevauchante) :
 - **Amplification de la nano** : amorces **sens** 5'-A CGT GAA TTC GCC GCC ATG GAC TAC AAG GAC GAC GAT GAC AAG GTC TTC ACA CTC GAA G-3' et **antisens** 5'- CAG GGC GGT ACT CGA GCC GCT GGA GCC CGC CAG AAT GCG TTC-3'.
 - **Amplification d'ASP** : amorces **sens** 5'- TCC AGC GGC TCG AGT ACC GCC CTG TTT TCT CTG TGC-3' et **antisens** 5'-ACT GCG AAT TCA CTG CAG CTC CAC GCA GGA GTT CAG CAG CAC CTG ATT CAG CAG TGA-3'.
 - **Amplification de nano-ASP 60-189 à partir des ORF nano et ASP (PCR chevauchante)** : amorces **sens** 5'-A CGT GAA TTC GCC GCC ATG GAC TAC AAG GAC GAC GAT GAC AAG GTC TTC ACA CTC GAA G-3' et **antisens** 5'-ACT GCG AAT TCA CTG CAG CTC CAC GCA GGA GTT CAG CAG CAC CTG ATT CAG CAG TGA-3'.

Les mutants nano-ASP **1-62** et nano-ASP **1-141** ont été générés en amplifiant par PCR classique la séquence codante de nano-ASP obtenue précédemment. Les amorces utilisées sont les suivantes :

- **Génération de la séquence codante nano-ASP 1-62** : amorces **sens** 5'-A CGT GAA TTC GCC GCC ATG GAC TAC AAG GAC GAC GAT GAC AAG GTC TTC ACA CTC GAA G-3' et **antisens** 5'-ACT GCG AAT TCA GGC GGT GGG GAT GGG GGC CTT GTT CCT -3'.

- **Génération de la séquence codante nano-ASP 1-141** : amorces **sens** 5'-A CGT GAA TTC GCC GCC ATG GAC TAC AAG GAC GAC GAT GAC AAG GTC TTC ACA CTC GAA G-3' et **antisens** 5'-ATG CTT GAA TTC TAC GAT GTA GGC GCC TC-3'.

Les réactions de PCR ont été réalisées dans un volume final de 50µL, en présence des réactifs suivants :

- 10 µL de tampon Q5 à 1X final (New England Biolabs)
- 1 µL de dNTP (10 mM chacun)
- 2.5 µL d'amorces sens et antisens à 10 µM chacune
- 25 ng de matrice d'ADN (50 ng des deux produits PCR pré-amplifiés pour les réactions de PCR chevauchante)
- 1 µL de Taq polymérase high-fidelity Q5 (New England Biolabs).

Toutes les PCR ont été réalisées à l'aide d'un thermocycleur (Eppendorf Mastercycler personal), en utilisant les paramètres suivants :

- Pour les **PCR classiques**:
 - Dénaturation 2 min à 98°C
 - 35 cycles : 10 s de dénaturation à 98°C
20 s d'hybridation à **60°C** (en fonction de la température de fusion des amorces utilisées)
40 s d'élongation à 72°C (en fonction de la taille de la séquence à amplifier ; l'élongation d'1 Kb est réalisée en 20-30 s par la polymérase Q5)
 - Extension finale de 2 min à 72°C
- Pour les **PCR chevauchantes** :
 - Dénaturation 2 min à 98°C
 - 10 cycles **sans amorces** :
 - ✓ 10 s de dénaturation à 98°C

- ✓ 20 s d'hybridation à **60°C** (en fonction de la température de fusion des amorces utilisées)
 - ✓ 1 min - 1 min 30 s d'élongation à 72°C (en fonction de la taille de la séquence à amplifier)
- ➔ les 10 premiers cycles sans amorce permettent l'élongation spécifique de la séquence formée par l'hybridation des deux produits PCR pré-amplifiés.
- 30 cycles **avec amorces** :
 - ✓ 10 s de dénaturation à 98°C
 - ✓ 20 s d'hybridation à **60°C** (en fonction de la température de fusion des amorces utilisées)
 - ✓ 1 min – 1 min 30 s d'élongation à 72°C (en fonction de la taille de la séquence à amplifier)
 - Extension finale de 2 min à 72°C

La totalité des produits obtenus à l'issue des PCR classiques et chevauchantes a été déposée sur gel agarose à 1%, puis les amplicons ont été extraits de la bande correspondante et purifiés sur colonne à l'aide du kit "PCR Clean-up Gel extraction" (Macherey-Nagel), selon le protocole recommandé par le fournisseur.

2. Le vecteur d'expression p-CAGGS et les produits PCR purifiés ont été digérés par l'enzyme EcoRI (New England Biolabs) pendant 1h à 37°C. La réaction de digestion a été réalisée dans un volume final de 50 µL, en présence des réactifs suivants :

- 5 µL de tampon CutSmart (New England Biolabs)
- 1 µg de produits PCR (insert) ou 2 µg de vecteur
- 1 µL d'enzyme EcoRI. Pour le vecteur
- 1 µL de phosphatase alcaline intestinale de veau (concentration finale de 0.2 U/µL ; Fermentas) a été ajoutée après 30 minutes de réaction pour dé-phosphoryler l'extrémité 5' du vecteur d'expression linéarisé.

Les produits de digestion ont été purifiés sur colonne à l'aide du kit "PCR Clean-up Gel extraction" (Macherey-Nagel), selon le protocole recommandé par le fournisseur.

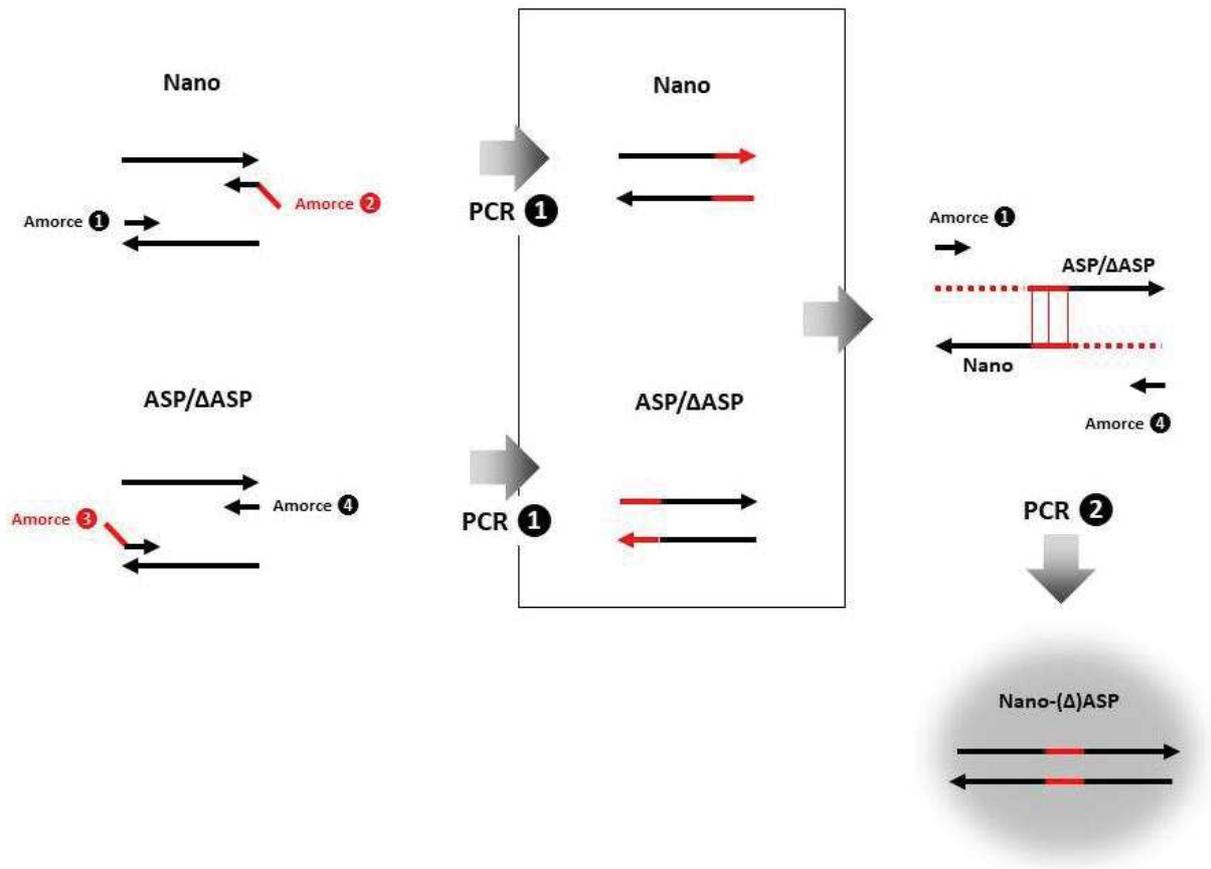


Figure 48 : Génération des séquences codantes nano-ASP, nano-ASP 26-189 et nano-ASP 60-189 par PCR chevauchante. Les séquences codantes de la nanoluciférase (nano), d'ASP, ou des formes mutantes d'ASP 26-189 et 60-189 (Δ ASP) sont amplifiées par PCR classique (PCR ①). Les amorces ② et ③ possèdent une séquence complémentaire (en rouge). Les deux produits formés à l'issue de la PCR ① sont complémentaires. Le produit formé par l'hybridation de nano et d'ASP/ Δ ASP est amplifié lors d'une deuxième réaction de PCR en utilisant les amorces ① et ④ (PCR ②).

3. L'insert et le vecteur ont été ligués. La ligation a été réalisée pendant 15 min à 37°C, dans un volume final de 20 μ L et en présence des réactifs suivants :

- 125 ng de vecteur p-CAGGS,
- x ng d'insert (quantité calculée de sorte à avoir un ratio molaire vecteur : insert de 1 : 5),
- 1 μ L de ligase T4 (Invitrogen)
- 2 μ L de tampon de réaction de la ligase T4 (New England Biolabs).

Les produits ligués obtenus ont été purifiés sur colonne à l'aide du kit "PCR Clean-up Gel extraction" (Macherey-Nagel), selon le protocole recommandé par le fournisseur.

4. La totalité des produits de ligation purifiés (20 µL) ont été utilisés pour transformer 50 µL de bactéries électrocompétentes de la souche DH5α à l'aide d'un électroporateur (Eppendorf Electroporator 2510). L'électroporation a été réalisée à 2500 V. Les bactéries transformées ont été cultivées 45 min à 37°C dans du milieu SOC (Thermofisher) puis étalées sur du milieu LB supplémenté d'ampicilline à 50 µg/mL (le gène de résistance à l'ampicilline est apporté par le vecteur p-CAGGS).
5. L'ADN correspondant à chaque construction a été amplifié en cellules procaryotes puis purifié. Toutes les cultures sont réalisées à 37°C et sous agitation à 180 rpm. Les clones bactériens exprimant les constructions d'intérêt (vérifiés par PCR et séquençage) ont été pré-cultivés sur la nuit dans 5 mL de milieu LB supplémenté d'ampicilline. De cette pré-culture, 2 mL ont été utilisés pour ensemercer une culture de 200 mL de milieu LB supplémenté d'ampicilline, de nouveau incubée sur la nuit. L'ADN est ensuite extrait de la culture bactérienne à l'aide du kit "NucleoBond® Xtra Midi / Maxi" (Macherey-Nagel).

2. RT-qPCR brin spécifique (voir partie IIIa des résultats)

a. Amorces de RT et de qPCR

Les amorces utilisées pour la reverse transcription (RT) des transcrits d'*asp* et de *gag* comportent une séquence non complémentaire du transcrit en 5' (séquence ancre) (**voir partie IIIa des résultats**). Cette séquence permet d'amplifier spécifiquement les ADNc issus de la reverse transcription de l'ARNm d'ASP, et non pas les ADN issus d'une éventuelle réaction d'auto-amorçage de l'ARN. Nous avons initialement conçu l'amorce de RT d'*asp* afin de détecter le transcrit d'*asp* dans des cellules de patients de différentes origines géographiques et infectés par différents sous-types et CRF du groupe M du VIH-1 (notamment les patients de la cohorte ANRS 12174 constituée pour l'étude PROMISE-PEP). Par conséquent, l'amorce de RT d'*asp* a été conçue pour s'hybrider à une séquence nucléotidique consensus générée par l'alignement des séquences du gène *asp* des principaux sous-types du groupe M du VIH-1. Afin de réaliser la séquence consensus la moins éloignée possible de la séquence des transcrits exprimés *in vivo*, l'amorce de RT d'*asp* a été conçue pour s'hybrider à la région 5' hautement conservée du transcrit. La séquence de l'amorce de RT complémentaire du transcrit de *gag* a été conçue pour être « universelle », c'est à-dire pour s'hybrider au transcrit de *gag* de

n'importe quel sous-type du groupe M du VIH-1. Les séquences ancres utilisées pour reverse transcrire spécifiquement les transcrits d'*asp* et de *gag* étaient respectivement dérivées du génome des organismes modèles *Danio rerio* (poisson zèbre) et *Arabidopsis thaliana*.

J'ai utilisé trois gènes de référence (*actine beta*, *rpl19* et *hprt*) pour normaliser la quantité des transcrits de *gag* et d'*asp* dans les échantillons. Ces 3 gènes étant fortement exprimés à un niveau basal dans les cellules analysées (T CD4+ totaux), l'amplification spécifique de leur transcrit par qRT-PCR ne nécessite pas l'utilisation d'une séquence ancre en 5' de l'amorce de RT. Toutes les amorces utilisées dans la réaction de RT-qPCR ont été conçues par Antoine Gross et ont été au préalable testées pour la formation éventuelle de dimères en utilisant le logiciel Primer-BLAST.

Les séquences des amorces de RT qui ont été utilisées sont les suivantes :

- *asp* : 5'- ATC ATG AAG CAT CTA GAT TCA AAG TGC TGC GGA GCA GCA GGA AG CAC TAT-3' (séquence ancre soulignée)
- *gag* : 5'-AAC GCG GGT CTT AGA TCG GAG AAG TCA TCC ATC CTA TTT GTT CCT GAA G-3' (séquence ancre soulignée)
- *actine beta* : 5'- AAG GGA CTT CCT GTA ACA ATG CA-3'
- *rpl19* : 5'- TGC GTG CTT CCT TGG TCT TA-3'
- *hprt* : 5'- GGC GAT GTC AAT AGG ACT CC-3'

L'amplification spécifique par PCR quantitative (qPCR) des ADNc d'*asp* et de *gag* comportant la séquence ancre en 5' à l'issue de l'étape de RT est réalisée au moyen d'une amorce antisens complémentaire à la séquence ancre et d'une amorce sens complémentaire à l'ADNc. Les séquences des amorces utilisées pour la qPCR sont les suivantes :

- *asp* ancre: amorces **sens** 5'- ATG CCC CAG ACT GTG AGT TG-3' et amorce **antisens** « ancre » 5'- ATC ATG AAG CAT CTA GAT TCA AAG TGC TGC-3' et
- *gag* ancre: amorces **sens** 5'- GTG GGG GGA CAT CAA GCA G-3' et **antisens** 5'- AAC GCG GGT CTT AGA TCG GAG AAG -3'.
- *actine beta* : amorces **sens** 5'- CCA ACC GCG AGA AGA TGA-3' et **antisens** 5'- CCA GAG GCG TAC AGG GAT AG-3'.
- *rpl19* : amorces **sens** 5'- CTC TAG TGT CCT CCG CTG TG-3' et **antisens** 5'- CTT CCG CTT ACC TAT GCC CA-3'.

- *hpvt* : amorces **sens** 5'- TGA CAC TGG CAA AAC AAT GCA-3' et **antisens** 5'- GGT CCT TTT CAC CAG CAA GCT-3'.

b. Extraction d'ARN et réaction de réverse transcription (RT)

L'ARN total est extrait des lymphocytes T CD4⁺ de patients (i) non-réactivés *ex vivo* et préservés à -80°C après leur isolation (**J0**) ou (ii) réactivés en culture *ex vivo* pendant 5 jours (**J5**) en présence d'IL-2. Les cellules récoltées à J0 et à J5 sont lysées pour extraire les ARN totaux à l'aide du "RNeasy Mini Kit" (Qiagen) selon le protocole recommandé par le fournisseur. Brièvement, les cellules sont lysées dans du tampon de lyse contenant du β-mercaptoéthanol, puis les lysats cellulaires sont homogénéisés en réalisant plusieurs aller-retours à l'aide d'une seringue et d'une aiguille 20G (0.9*40 mm, BD Microlance). Les ARN totaux du lysat homogénéisé sont purifiés sur colonne après plusieurs étapes de lavage et de centrifugations, puis élués dans 20 µL d'eau pré-chauffée à 70°C.

La totalité des cellules récoltées à J0 et à J5 est utilisée pour l'extraction. La concentration et la pureté des ARN totaux obtenus sont évaluées à l'aide d'un nanodrop (Nanodrop 2000 Spectrophotometer, Thermo Scientific). La quantité d'ARN utilisée comme matrice dans la réaction de RT dépend de la quantité d'ARN totale extraite de chaque patient et s'échelonne de 160 ng à 1.2 µg. La quantité d'ARN total ajouté dans la réaction de RT différant d'un patient à l'autre, les quantités relatives des transcrits d'*asp* et de *gag* n'ont pas été comparées entre les différents patients. La réaction de RT a été réalisée pendant 1h à 55°C avant d'être inactivée 15 min à 70°C. La réaction dans un volume final de 40 µL comme suit :

1. Ajout de :

- 160 ng à 1.2 µg d'ARN totaux
- 2µL de mix contenant les amorces de RT *asp* ancre, *gag* ancre, *hpvt*, *rpl19* et *actinebeta* à une concentration finale de 0.2 µM chacun
- 2µL de dNTP (Invitrogen) à une concentration finale de 10 mM chacun

2. Chauffage des réactifs à 65°C pendant 5 min, puis incubation sur glace pendant 2 min.

3. Ajout de :

- 8µL de tampon "First-strand Buffer 5X" (Invitrogen)
- 2µL de DTT à 0.1M (Invitrogen)
- 2µL d'enzyme **Superscript III** (Thermofisher)

Les ADNc obtenus sont ensuite purifiés sur colonne à l'aide du kit "PCR Clean-up Gel extraction" (Macherey-Nagel), selon le protocole recommandé par le fournisseur. Les ADNc élués dans 40µL d'eau servent ensuite de matrice pour la réaction de qPCR.

c. Réaction de qPCR

L'amplification par qPCR des ADNc *asp-ancre*, *gag-ancre* et des trois gènes de référence est réalisée en triplicat dans une plaque 384 puits. La réaction est effectuée dans un volume final de 5 µL en ajoutant les réactifs suivants :

- 2.5 µL de "lightcycler 480 SYBR green II master mix" (thermofisher), une solution commerciale prête à l'emploi qui contient des dNTP, l'ADN polymérase et le SYBR green, un agent fluorescent intercalant de l'ADN.
- 0.5 µL d'amorces sens et antisens de l'ADNc cible (10µM chacune)
- 2 µL d'ADNc matrice correspondant aux 40µL élués à l'issue de la purification des ADNc sur colonne.

Les paramètres utilisés pour la réaction de qPCR sont les suivants :

- 5 min à 95°C
- 55 cycles :
 - ✓ 10 s de dénaturation à 95°C
 - ✓ 10 s d'hybridation à 60°C
 - ✓ 10 s d'élongation à 72°C

La lecture de la fluorescence est réalisée par l'appareil LightCycler 480 Instrument II, (Roche). A la fin de la qPCR, la température de fusion ou **T_m** à laquelle 50% de l'ADN est dénaturé est mesurée. La comparaison de la T_m des échantillons à celle de la gamme étalon du gène cible considéré constitue un contrôle de spécificité du signal obtenu par qPCR.

d. Gamme étalon et analyse des résultats (voir partie IIIa des résultats)

Les transcrits d'*asp* et de *gag* sont quantifiés de manière relative dans les cellules de patients, selon la **méthode des droites standards**. Cette méthode, qui repose sur l'utilisation de gammes étalons internes pour chaque gène (gènes cible et gènes de référence) permet la normalisation de la quantité des transcrits cibles par rapport à la quantité de transcrits de gènes de référence au sein d'un même échantillon. J'ai utilisé trois gènes de référence (*actine beta*, *rpl19* et *hprt*) pour normaliser la quantité des transcrits de *gag* et d'*asp* dans les échantillons.

Pour chaque gène cible et chaque gène de référence (*asp*, *gag*, *actine beta*, *rpl19* et *hprt*), j'ai réalisé une **gamme étalon** à partir d'amplicons. Ces amplicons ont été obtenus en amplifiant par RT-qPCR les transcrits d'*asp*, de *gag*, d'*actine beta*, de *rpl19* et de *hprt* extraits d'une lignée de Jurkat infectées *ex vivo* par un virus NLAd8, qui a été générée avant mon arrivée. Les amplicons ont été purifiés par migration sur gel d'agarose à 2%, puis séquencés. Après détermination de leur concentration en ADN à l'aide du nanodrop, les amplicons ont été dilués en série de sorte à obtenir une gamme de dilution d'amplicons allant de 10^0 à 10^7 copies par μL pour chaque gène considéré. Les dilutions allant de 10^2 à 10^7 copies par μL ont été utilisées pour générer une courbe d'étalonnage standard pour les 5 gènes (**voir partie IIIa des résultats**). Une réaction de qPCR a ensuite été réalisée sur l'ensemble des dilutions d'amplicons de chaque gène, afin (i) d'évaluer l'efficacité des couples d'amorces spécifiques de chaque gène et (ii) de définir pour chaque gène une **droite d'étalonnage standard**, utilisée pour quantifier de manière relative les transcrits d'*asp* et de *gag* relativement aux transcrits des 3 gènes de ménage. L'efficacité des couples d'amorces utilisés pour amplifier par qPCR les ADNc de *gag*, d'*asp* et des 3 gènes de ménage est comprise entre 1.847 (*asp*) et 1.922 (*actine beta*).

Seul le point correspondant à la dilution à 10^4 copies/ μL de chaque gène a été déposé lors des expériences de qPCR sur des échantillons de patients de lignées cellulaires infectées (**gamme d'étalonnage interne**). Chaque réaction a été effectuée en triplicat. Dans chaque expérience de qPCR et pour chaque couple d'amorces, une réaction de qPCR a été réalisée en l'absence d'ADNc (**contrôle négatif sans matrice**). Pour l'ensemble des expériences de qPCR, ont été considérés comme spécifiques les signaux (i) détectés à un cycle seuil (Ct) inférieur à celui du signal éventuellement détecté dans le contrôle sans matrice et (ii) dont la T_m est identique à celle des amplicons de la gamme étalon du gène considéré. Les résultats ont été analysés à l'aide de la version 1.5 du logiciel LightCycler 480 (Roche life Science).

III. Immuno-assays

1. Western-blot

Une condition déposée dans un puits de western-blot correspond aux protéines extraites d'un puits de plaque 6 puits ensemencé de HEK 293 T. Les HEK transfectées ou non avec les constructions p-CAGGS vide, p-CAG-nano, p-CAG-nano-ASP ou p-CAG-nano- Δ ASP ont été lysées dans deux tampons différents :

- **Dans le cas particulier du western-blot réalisé sur les formes mutantes nano- Δ ASP**, la quantité de protéines déposées a été normalisée en fonction de l'activité de la nano (mesurée par le nombre de Light Units (LU) après ajout du substrat de la nano). Les HEK ont été lysées dans le tampon utilisé pour préparer les antigènes du LIPS précédemment décrit par Burbelo et al. (50 mM Tris, pH 7.5, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 1% Triton X-100, 50% glycerol) (Burbelo et al. 2009).
- **Pour les autres expériences de western-blot**, les HEK ont été lysées dans du tampon phosphate (25mM Tris-phosphate pH 7.8, 2mM DTT, 2mM EDTA, 10% glycerol, 1% Triton X-100). Les extraits protéiques ont ensuite été dosés à l'aide du réactif de Bradford (BioRad, Hercules, CA). Le dépôt sur gel des extraits protéiques a été normalisé de sorte à obtenir une quantité équivalente en protéines totales d'un puits à l'autre.

Les western-blots ont été réalisés comme suit :

1. **Dénaturation** des protéines dans du tampon Laemmli 1X (NuPAGE ; Invitrogen) supplémenté de Dithiothréitol (DTT, 0.2 μ M final) et chauffage des extraits protéiques 15 min à 95°C.
2. **Séparation** des protéines dénaturées sur gel Tricine-SDS-PAGE à 13% (pour 10 mL de gel Tricine-SDS-PAGE à 13%: 2.6 mL d'acrylamide/bisacrylamide ; 3.3 mL Tris 3M HCl pH 8.45 ; 1.58 mL glycérol ; 75 μ L APS 10% ; 7.5 μ L TEMED ; 3.4 mL d'eau)

3. Transfert des protéines sur membrane PVDF (Immobilon-P Transfer Membranes ; Merck) en appliquant un courant électrique de 60V pendant 2h à 4°C.

4. Blocage de la membrane avec 0.3% de caséine.

5. Révélation des protéines avec les anticorps suivants :

- **Nano, nano-ASP et mutants nano-ΔASP** : anticorps primaire de lapin anti-FLAG (DYKDDDDK) (Bethyl, ref. A190-102A), et anticorps secondaire de chèvre anti-Immunoglobuline de lapin couplé à la HRP (Biolegend).
- **GAPDH** : anticorps de souris anti-GAPDH couplé à la HRP (Sigma-Aldrich, Clone GAPDH-71.1).

Après ajout du substrat de la HRP (Immobilon Classico Western HRP substrate luminata classico ; Merck Millipore), le signal obtenu est révélé au Chemidoc™ Imaging System (Biorad). Les images sont analysées à l'aide du logiciel ImageJ.

2. Luciferase Immunoprécipitation System (LIPS)

J'ai apporté deux modifications au protocole de Luciferase ImmunoPrecipitation System (LIPS) décrit par Burbelo et al. (Burbelo et al. 2009) : **(i)** l'utilisation de la protéine nanoluciférase fusionnée à l'antigène d'intérêt (ASP) au lieu de la *renilla* luciférase, et **(ii)** la réalisation des étapes de lavage par centrifugation, et non par aspiration à l'aide d'une pompe à vide.

La nanoluciférase (nano) est une protéine de 19 KDa qui a été conçue en réalisant une série de mutations d'optimisation de la séquence codant la petite sous-unité de la luciférase de la crevette marine *Oplophorus gracilirostris* (Hall et al. 2012). Le substrat utilisé pour la nano est la furimazine, un analogue de la coelentérazine utilisée comme substrat pour les luciférases *renilla* et *firefly*. L'oxydation de la furimazine en furimamide s'accompagne de la production d'un produit luminescent. En utilisant la furimazine comme substrat, le signal obtenu avec la

nano est supérieur d'un facteur 150 à celui obtenu avec les luciférases *renilla* et *firefly* (Figure 49). La petite taille, la brillance et la stabilité de la nano en font un candidat de choix pour la réalisation de protéines de fusion avec différentes protéines d'intérêt. Pour ces différentes raisons, j'ai généré une protéine de fusion nano-ASP pour détecter par LIPS les anticorps dirigés contre ASP dans des échantillons biologiques de patients.

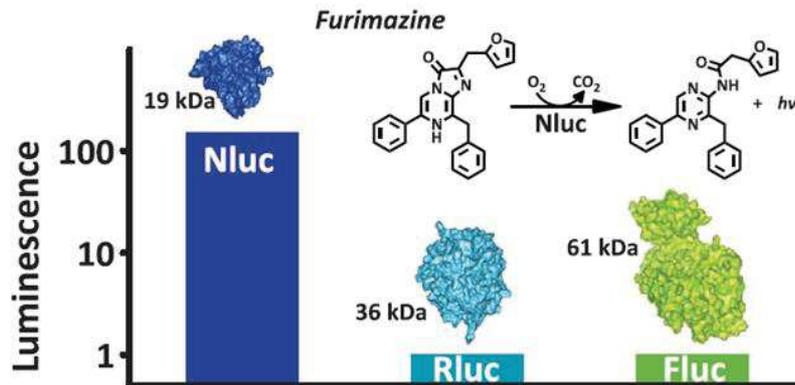


Figure 49: Comparaison de l'intensité du signal luminescent obtenu avec les protéines nanoluciférase (Nluc), *renilla* luciférase (Rluc) et *firefly* luciférase (Fluc) après ajout du substrat furimazine (Nluc) ou coelentérazine (Rluc et Fluc) (Hall et al. 2012).

Les grandes étapes de la préparation des antigènes nano-ASP et du déroulement du LIPS sont décrites ci-dessous. Sauf précisé, toutes les étapes du LIPS ont lieu dans un tampon réactionnel, le **tampon A**, composé de : 50 mM de Tris, pH 7.5 ; 100 mM de NaCl ; 5 mM de MgCl₂ ; 1% de Triton X-100.

a. Récolte et préparation des lysats cellulaires

1. Des cellules HEK 293T sont transfectées avec les constructions p-CAGGS-nano, p-CAGGS-nano-ASP, ou p-CAGGS-ΔASP en plaque 6 puits (voir paragraphe 11a du matériel et méthodes). Un seul type de construction est transfecté par puits.
2. Les cellules sont lysées 48 h post-transfection en 3 étapes :

- Ajout de 250µL du tampon de lyse décrit par Burbelo et al (50 mM Tris, pH 7.5 ; 100 mM NaCl ; 5 mM MgCl₂ ; 1% Triton X-100 ; 50% glycérol pour 50 ml) (Burbelo et al. 2009).
- Sonication (amplitude 30, Vibra-Cell Ultrasonic Processor, Bioblock scientific).
- Centrifugation 2*4 min à 12500 rpm à 4°C.

Le surnageant protéique obtenu constitue **l'extrait protéique qui sera incubé avec les plasmas de patients lors de la technique LIPS.**

3. L'activité enzymatique de la nano, mesurée en Light Units (LU), est déterminée dans les extraits protéiques correspondant à chaque construction (nano, nano-ASP et nano-ΔASP). Dans chaque réaction de LIPS, la quantité d'extrait protéique ajoutée est normalisée de sorte à obtenir un signal théorique de **1.10⁷ LU** (sans immuno-précipitation). La normalisation de la quantité d'extrait ajoutée dans la réaction par rapport au signal luminescent permet de s'affranchir des biais dus **(i)** aux différences d'expression des protéines nano/nano-ASP/nano-ΔASP par les HEK 293 T et **(ii)** aux éventuelles différences de rendement de l'étape de lyse. Pour déterminer cette quantité, j'ai réalisé une droite d'étalonnage pour les extraits correspondant à chaque construction, en effectuant des dilutions en série. Les dilutions sont réalisées dans le tampon A.

b. Origine, isolation et préparation des échantillons de plasma et de lait maternel

Les échantillons de plasma analysés provenaient de donneurs séronégatifs et de patients infectés par le VIH-1 qui étaient inclus dans différentes cohortes (**voir paragraphe IV du matériel et méthodes pour les considérations éthiques**) :

- **Les échantillons de plasma de donneurs séronégatifs** ont été isolés d'échantillons de sang totaux fournis par l'Etablissement français du sang (EFS) selon la procédure suivante : centrifugation du sang total 10 min à 500g à température ambiante, puis centrifugation 10 min à 500g du surnageant obtenu.
- **Les échantillons de plasma de donneuses séronégatives allaitantes originaires de Zambie** ont été généreusement fournis par le Dr. Jean-Pierre Molès (INSERM PCCI

U1058) et le Pr. Philippe Van de Perre (INSERM PCCI U1058 ; EFS ; Université de Montpellier ; CHU de Montpellier).

- **Les échantillons de plasma de patientes infectées par le VIH-1 originaires du Burkina-Faso et incluses dans l'étude clinique PROMISE-PEP** (Nagot et al. 2016) ont été fournis par le Dr. Jean-pierre Molès (INSERM PCCI U1058), le Dr. Edouard Tuillon (CHU de Montpellier ; EFS ; INSERM PCCI U1058 ; Université de Montpellier) et le Pr. Philippe Van de Perre (INSERM PCCI U1058 ; EFS ; Université de Montpellier ; CHU de Montpellier).
- **Les échantillons de plasma de patients français infectés par le VIH-1 qui étaient sous ART et en consultation au CHU de Montpellier** ont été obtenus d'échantillons de sang totaux fraîchement isolés selon la procédure suivante : centrifugation du sang total 10 min à 500g à température ambiante, puis centrifugation 10 min à 500g du surnageant obtenu (**voir paragraphe I2 du matériel et méthodes**). Les échantillons de sang totaux ont été généreusement fournis par le Dr. Edouard Tuillon (CHU de Montpellier ; EFS ; INSERM PCCI U1058 ; Université de Montpellier).
- **Les échantillons de plasma de patients français infectés par le VIH-1 et inclus dans la cohorte ANRS CO2 SEROCO** ont été généreusement fournis par le Dr. Faroudy Boufassa (INSERM CESP U1018, Université Paris Sud, Le Kremlin Bicêtre), le Dr. Laurence Meyer (INSERM CESP U1018, Université Paris Sud, Le Kremlin Bicêtre) et le Pr. Olivier Lambotte (Département de médecine Interne et d'Immunologie clinique, Hôpital Universitaire Bicêtre, Le Kremlin Bicêtre ; Université Paris Sud, INSERM, CEA UMR 1184).
- **Les échantillons de plasma de patients français et africains infectés par le VIH-1 et inclus dans la cohorte ANRS HIV Controller CO21 CODEX** ont été généreusement fournis par le Dr. Camille LECUROUX (IMVA, Université Paris Sud, INSERM Le Kremlin Bicêtre) et le Pr. Olivier Lambotte (Département de médecine Interne et d'Immunologie clinique, Hôpital Universitaire Bicêtre, Le Kremlin Bicêtre ; Université Paris Sud, INSERM, CEA UMR 1184).

Tous les plasmas ont été aliquotés et préservés à -80°C . Le nombre de cycles de congélation-décongélation de chaque aliquot n'a pas excédé 5 fois.

Les échantillons de lait maternel étudiés ont été isolés des patientes incluses dans la cohorte PROMISE-PEP décrites ci-dessus, et fournis par le Dr Jean-Pierre Molès et le Pr Philippe Van de Perre.

Avant leur utilisation dans le LIPS, les échantillons de plasmas et de lait maternel ont été dilués au $1/10^{\circ}$ dans le tampon A. Les échantillons de plasma et de lait maternel sont dilués au $1/100^{\circ}$ dans la réaction de LIPS ($10\ \mu\text{L}$ de plasma dilué au $1/10^{\circ}$ dans un volume réactionnel final de $100\ \mu\text{L}$). Au final, **l'équivalent de $1\ \mu\text{L}$ de plasma et de lait maternel pur** est utilisé par réaction de LIPS.

c. Réalisation du LIPS

Les réactions de LIPS sont réalisées en plaque 96 puits, dans un milieu réactionnel de $100\ \mu\text{L}$. Chaque échantillon de patient est analysé en triplicat (dans 3 puits différents). Les incubations sont réalisées 1h sous agitation à 250 rpm et à température ambiante. Les principales étapes du LIPS sont les suivantes :

1. Les extraits protéiques enrichis en nano, nano-ASP ou en mutants nano- Δ ASP sont incubés avec les plasmas de patients ou de donneurs séronégatifs dans une plaque 96 puits à fond plat (Falcon). Le volume d'extrait protéique ajouté par réaction correspond au volume nécessaire pour obtenir un signal théorique de **$1.10^7\ \text{LU}$** (sans immuno-précipitation). Une fraction de $50\ \mu\text{L}$ de l'extrait protéique à $1.10^7\ \text{LU}$ est conservée pour être déposée lors la lecture de la luminescence (INPUT). Le volume réactionnel est ajusté à $100\ \mu\text{L}$ avec du tampon A. A cette étape, sont présents dans chaque réaction :
 - $10\ \mu\text{L}$ de plasma ou de lait maternel au préalable dilués au $1/10^{\circ}$
 - $X\ \mu\text{L}$ (calculé pour avoir $1.10^7\ \text{LU}$) d'extrait protéique
 - Qsp $100\ \mu\text{L}$ de tampon A
2. Les complexes anticorps-nano-ASP/nano- Δ ASP formés sont incubés avec des billes de sépharose couplées à des protéines chimériques A/G. Un volume de $5\ \mu\text{L}$ d'une suspension composée à 30% de billes (Pierce Protein A/G Ultralink resin, Thermo Scientific) et à 70%

de PBS 1X est ajouté à chaque réaction. Le volume de billes ajouté (1.5 μ L par puits) a été calculé de sorte à permettre l'immuno-précipitation de **la totalité des IgG présentes dans 1 μ L de plasma humain** (10-15 mg d'IgG/mL) (Burbelo et al. 2009).

3. Les protéines qui non pas été immuno-précipitées sont éliminées par lavage. Le milieu réactionnel de chaque puits est transféré dans une plaque 96 puits à fond conique (Cellstar Cell Culture microplate, Greiner Bio-One). Un total de 4 lavages dans 100 μ L de tampon A et de 2 lavages dans 100 μ L de PBS 1X sont réalisés. Chaque lavage est effectué en centrifugeant la plaque 2 min à 2000g. Suite au dernier lavage, les culots de complexes billes/anticorps-nano-ASP/ Δ ASP sont repris dans 50 μ L de PBS 1X.
4. La luminescence correspondant à chaque échantillon de patient (plasma ou lait maternel) est révélée comme suit :
 - Transfert des complexes billes-anticorps-nano-ASP/nano- Δ ASP en plaque blanche 96 puits à fond plat (SPL Cell Culture Plate, SPL Life Science).
 - Ajout du substrat de la nano (NanoGlo, Promega), à raison de 50 μ L dilué au 1/50^e par réaction.
 - Lecture de la luminescence au luminomètre (Centro LB 960 Microplate Luminometer, Berthold), à l'aide du logiciel Mikrowin 2000 avec les paramètres suivants : 4 s d'agitation, 0.1 s de lecture.

Afin de diminuer l'impact d'une éventuelle valeur hétérogène obtenue pour l'un des triplicats réactionnels, j'ai défini la valeur de luminescence obtenue pour chaque échantillon de patient comme la valeur médiane de luminescence de ses trois réplicats réactionnels. Par ailleurs, afin de m'assurer de la reproductibilité du signal obtenu pour chaque patient, j'ai effectué trois réplicats d'expérience.

d. Test du LIPS avec un anticorps monoclonal anti-ASP

Avant d'utiliser le LIPS pour rechercher des anticorps anti-ASP dans le plasma et le lait maternel de patients, la réaction de LIPS a dans un premier temps été réalisée en utilisant un anticorps monoclonal dirigé contre ASP (Mab α -ASP). Différentes dilutions du Mab α -ASP (de 0.3125 à 10 ng/ μ L) ont été testées. Les dilutions du Mab α -ASP ont été réalisées dans un

mélange à volume équivalent du plasma de 4 des 20 donneurs séronégatifs français décrits **dans le paragraphe III2c des résultats**. Le Mab α -ASP est dirigé contre les résidus 47-62 d'ASP (PAAPKNPRNKAP-IPT) (**Figure 50**). Le Mab α -ASP a été produit par la société EUROGENTEC (Belgique) dans des hybridomes de souris au préalable immunisées avec le peptide 47-62 d'ASP. Le surnageant de culture des hybridomes a ensuite été purifié sur colonne par affinité avec la protéine A. La concentration finale du Mab α -ASP purifié est de 3.1 mg/mL.

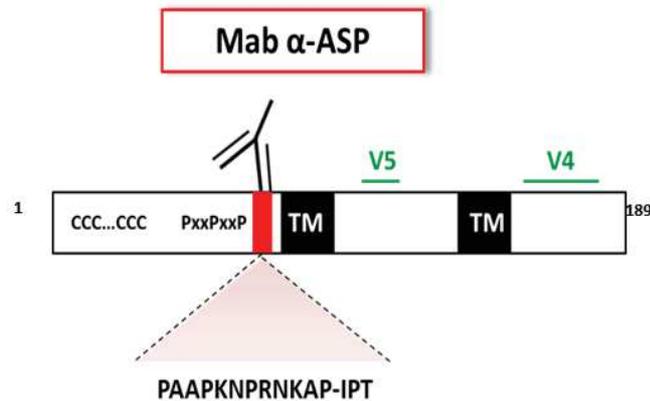


Figure 50 : Epitope d'ASP reconnu par l'anticorps monoclonal anti-ASP.

e. Normalisation des signaux luminescents par rapport à une gamme étalon anti-Flag

D'une expérience à l'autre, les signaux obtenus sont reproductibles, mais l'intensité du signal luminescent peut varier en fonction (i) de la préparation du substrat de l'enzyme (dilué extemporanément dans le tampon commercial fourni avec le substrat), (ii) de la préparation des extraits cellulaires (dilués extemporanément de sorte à ajouter 1.10^7 LU théoriques par réaction) ou (iii) du tampon A réactionnel, filtré sur pores de $0.2 \mu\text{m}$ avant chaque expérience, et renouvelé toutes les 4 expériences.

Afin de minimiser l'impact de ces variations sur le signal, j'ai intégré à chaque expérience de LIPS une **gamme de dilutions d'un anticorps anti-Flag** (qui reconnaît la séquence en N-ter de la nano ; **Figure 47**). J'ai ensuite normalisé l'ensemble des signaux luminescents obtenus dans une même expérience de LIPS en comparant le signal de cette gamme anti-Flag déposée en interne à celle d'une gamme anti-Flag que j'ai utilisée comme **standard externe** (**Figure 51**). L'anticorps anti-Flag immuno-précipitant avec la même efficacité les différentes protéines nano, nano-ASP et nano- Δ ASP (données non présentées), j'ai uniquement utilisé la protéine nano-ASP pour réaliser les gammes anti-Flag interne et externe.

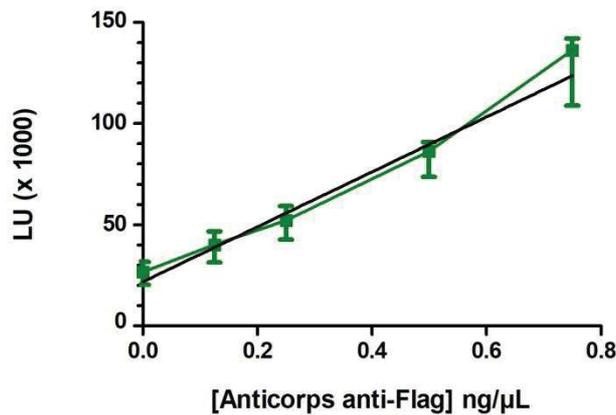


Figure 51 : Droite étalon de la gamme de l'anticorps anti-Flag utilisée comme standard externe. La gamme anti-Flag externe (représentée en vert) a été réalisée en effectuant un LIPS avec la nano-ASP sur différentes dilutions de l'anticorps anti-Flag (à 0.125 ; 0.25 ; 0.5 et 0.75 ng/μL). Le "point 0" a été obtenu en réalisant un LIPS en l'absence d'anticorps anti-Flag, mais en présence du mélange à volume équivalent du plasma des 4 donneurs séronégatifs français. Les données représentent la valeur médiane (plus valeurs min et max) obtenue lors d'une expérience réalisée en triplicats. La droite de régression linéaire de la gamme étalon externe est représentée en noir.

Pour réaliser les gammes anti-Flag interne et externe, j'ai effectué des dilutions de l'anticorps anti-Flag allant de 0.75 ng/μL à 0.125 ng/μL dans un mélange à volume équivalent du plasma de 4 donneurs séronégatifs français, comme décrit pour le Mab α-ASP. J'ai utilisé l'anticorps anti-Flag préalablement décrit dans la **partie III1 du matériel et méthodes**.

La normalisation des signaux luminescents s'est effectuée en comparant les signaux obtenus pour les gammes anti-Flag interne et externe, selon l'équation de normalisation suivante :

$$LU_{\text{normalisée}} = a_{\text{ext}} \times \frac{y_{\text{int}} - b_{\text{int}}}{a_{\text{int}}} + b_{\text{ext}}$$

Où les équations des droites de régression linéaire obtenues avec les gammes anti-Flag interne (int) et externe (ext) sont respectivement :

$$y_{\text{int}} = a_{\text{int}} \times x + b_{\text{int}}$$

$$y_{\text{ext}} = a_{\text{ext}} \times x + b_{\text{ext}}$$

La luminescence obtenue après normalisation est exprimée en **Relative Light Units (RLU)**. Pour les expériences réalisées sur les mutants nano- Δ ASP, les valeurs de luminescence n'ont pas été normalisées en utilisant la gamme anti-Flag (**voir partie III2f du matériel et méthodes**).

f. Normalisation des signaux obtenus pour les mutants nano- Δ ASP

Pour les réactions de LIPS réalisées sur les mutants nano- Δ ASP, j'ai ajouté dans la réaction la quantité d'extrait protéique permettant d'obtenir un signal théorique de **1.10⁷ LU**. Pour un patient donné, le signal luminescent obtenu avec les mutants nano- Δ ASP a été exprimé en pourcentage (%) du signal obtenu avec la forme entière de nano-ASP. L'expression du signal des mutants nano- Δ ASP relativement au signal de la forme entière nano-ASP permet de s'affranchir des éventuelles variations du signal inter-expérience. Par conséquent, je n'ai pas normalisé les signaux obtenus dans ces expériences en utilisant les gammes anti-Flag. En revanche, le bruit de fond luminescent associé à chaque mutant est différent (Figure 52).

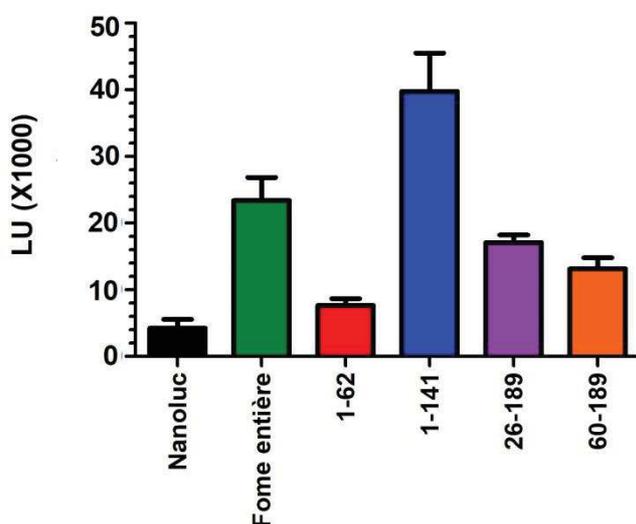


Figure 52 : Bruit de fond luminescent associé à la forme entière de nano-ASP et aux différents mutants nano- Δ ASP. Un LIPS a été réalisé sur la forme entière de nano-ASP, et les différents mutants nano- Δ ASP. Les données représentent la moyenne des valeurs médianes obtenues de 3 expériences réalisées en triplicats.

Afin que les signaux détectés pour chaque mutant ne soient pas biaisés par leurs différences de bruit de fond respectives, j'ai normalisé les signaux obtenus pour chaque mutant de la manière suivante :

- Pour le **mutant 1-141** qui présente un bruit de fond **supérieur** à celui de la **forme entière nano-ASP**, le signal luminescent correspondant à cet **excédent** de bruit de fond obtenu a été **retranché** du signal brut.
- Pour les mutants **1-62**, **26-189** et **60-189** qui présentent un bruit de fond **inférieur** à celui de la **forme entière nano-ASP**, le signal luminescent correspondant à cette différence de bruit de fond a été **ajouté** au signal brut.

Les valeurs de luminescence normalisées par rapport au bruit de fond des différents mutants sont également exprimées en **RLU**.

IV. Description des cohortes de patients et considérations éthiques

Cohorte ANRS 12174: les individus inclus dans cette cohorte étaient des femmes allaitantes séropositives pour le VIH-1 dont les enfants étaient inclus dans l'étude clinique PROMISE-PEP (Nagot et al. 2016). A des fins prophylactiques, toutes les femmes ont reçu de la zidovudine (AZT) pendant 4 à 16 semaines au cours de leur grossesse, puis une combinaison de zidovudine et de lamivudine pendant 7 jours après délivrance. La prophylaxie a été arrêtée 7 jours après délivrance car les femmes n'étaient pas éligibles pour l'ART post-partum selon les recommandations nationales au moment où l'étude clinique a été conduite (leur taux de T CD4+ était supérieur à 350 cellules CD4+/ μ L de sang) (Nagot et al. 2016). Des échantillons de plasma et de lait maternel ont été prélevés 38 semaines post-partum ainsi qu'à des points temporels intermédiaires quand cela était nécessaire. L'étude a été réalisée en accord avec la charte éthique de l'Agence Nationale de Recherche sur le Sida et les hépatites virales (ANRS), et avec les principes et les bonnes pratiques cliniques de la Déclaration d'Helsinki. Le protocole a été approuvé par le comité d'éthique national (n° 2008-0039).

Patients du CHU de Montpellier sous ART : Les sujets ont fourni un consentement écrit et l'étude a été approuvée par un comité éthique institutionnel (RCB n° 2011-A01566-35, AC-2011-1405).

Cohorte ANRS CO2 SEROCO: Les individus, inclus dans la cohorte entre 1988 et 1995 (i) ont été infectés au plus tôt un an avant leur inclusion et (ii) ne présentaient pas de maladies liées au SIDA au moment de leur inclusion (Hubert et al. 2000). Aucun agent antirétroviral (ARV) n'a été reçu par les patients avant l'inclusion et durant l'étude jusqu'en 1996. Un suivi a été réalisé tous les 6 mois jusqu'à 2009. Un consentement écrit a été fourni par les patients, conformément aux recommandations formulées par le comité d'éthique local.

Cohorte ANRS de HIV Controller CO21 CODEX : les individus inclus dans l'étude clinique répondaient aux critères suivants : (i) naïfs de tout traitement, (ii) séropositifs depuis au moins 5 ans avant l'inclusion et (iii) présentant une charge virale inférieure à 400 copies d'ARN viral/mL au cours des 5 mesures consécutives qui ont précédé leur inclusion (Lambotte et al. 2005; Sáez-Cirión et al. 2007a). La cohorte C021 CODEX a été approuvée par le comité de revue éthique d'Ile de France VII et réalisée en accord avec les principes de la Déclaration d'Helsinki.

Donneurs séronégatifs non infectés: Le sang total de donneurs séronégatifs français a été obtenu par l'Etablissement Français du Sang (EFS). Les échantillons de plasma de donneuses séronégatives zambiennes et allaitantes ont été généreusement fournis par Jean-Pierre Molès (INSERM PCCI U1058). L'étude a été approuvée par le Comité de Revue Institutionnel en Science et en Recherche Ethique (numéro IRB 00005948) à Lusaka, Zambie.

Références

- 2nd edition. Geneva: World Health Organization. Consolidated Guidelines on the Use of Antiretroviral Drugs for Treating and Preventing HIV Infection: Recommendations for a Public Health Approach [Internet]. 2nd éd. Geneva: World Health Organization; 2016 [cité 20 août 2019]. (WHO Guidelines Approved by the Guidelines Review Committee).
- Abdel-Mohsen M, Kuri-Cervantes L, Grau-Exposito J, Spivak AM, Nell RA, Tomescu C, et al. CD32 is expressed on cells with transcriptionally active HIV but does not enrich for HIV DNA in resting T cells. *Sci Transl Med.* 18 avr 2018;10(437).
- Accola MA, Bukovsky AA, Jones MS, Göttinger HG. A conserved dileucine-containing motif in p6(gag) governs the particle association of Vpx and Vpr of simian immunodeficiency viruses SIV(mac) and SIV(agn). *J Virol.* déc 1999;73(12):9992-9.
- Adachi A, Gendelman HE, Koenig S, Folks T, Willey R, Rabson A, et al. Production of acquired immunodeficiency syndrome-associated retrovirus in human and nonhuman cells transfected with an infectious molecular clone. *J Virol.* août 1986;59(2):284-91.
- Adhya S, Gottesman M. Promoter occlusion: transcription through a promoter may inhibit its activity. *Cell.* juill 1982;29(3):939-44.
- Affram Y, Zapata JC, Gholizadeh Z, Tolbert WD, Zhou W, Iglesias-Ussel MD, et al. The HIV-1 antisense protein ASP is a transmembrane protein of the cell surface and an integral protein of the HIV-1 viral envelope. *J Virol.* 2019 Oct 15;93(21).
- Agostini I, Navarro JM, Rey F, Bouhamdan M, Spire B, Vigne R, et al. The human immunodeficiency virus type 1 Vpr transactivator: cooperation with promoter-bound activator domains and binding to TFIIB. *J Mol Biol.* 6 sept 1996;261(5):599-606.
- Aiken C, Trono D. Nef stimulates human immunodeficiency virus type 1 proviral DNA synthesis. *J Virol.* août 1995;69(8):5048-56.
- Alexander L, Weiskopf E, Greenough TC, Gaddis NC, Auerbach MR, Malim MH, et al. Unusual Polymorphisms in Human Immunodeficiency Virus Type 1 Associated with Nonprogressive Infection. *Journal of Virology.* 1 mai 2000;74(9):4361-76.
- Alkhatib G, Combadiere C, Broder CC, Feng Y, Kennedy PE, Murphy PM, et al. CC CKR5: a RANTES, MIP-1alpha, MIP-1beta receptor as a fusion cofactor for macrophage-tropic HIV-1. *Science.* 28 juin 1996;272(5270):1955-8.
- Allan JS, Coligan JE, Lee TH, McLane MF, Kanki PJ, Groopman JE, et al. A new HTLV-III/LAV encoded antigen detected by antibodies from AIDS patients. *Science.* 15 nov 1985;230(4727):810-3.
- Altfeld M, Addo MM, Rosenberg ES, Hecht FM, Lee PK, Vogel M, et al. Influence of HLA-B57 on clinical presentation and viral control during acute HIV-1 infection: *AIDS.* déc 2003;17(18):2581-91.
- Amino N, Tanizawa O, Miyai K, Tanaka F, Hayashi C, Kawashima M, et al. Changes of serum immunoglobulins IgG, IgA, IgM, and IgE during pregnancy. *Obstet Gynecol.* oct 1978;52(4):415-20.
- Ananworanich J, Schuetz A, Vandergeeten C, Sereti I, de Souza M, Rerksnimitr R, 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(3):e33948.

- Anyanwu SI, Doherty A, Powell MD, Obialo C, Huang MB, Quarshie A, et al. Detection of HIV-1 and Human Proteins in Urinary Extracellular Vesicles from HIV+ Patients. *Adv Virol.* 2018;2018:7863412.
- Archin NM, Margolis DM. Emerging strategies to deplete the HIV reservoir. *Curr Opin Infect Dis.* févr 2014;27(1):29-35.
- Arhel N. Revisiting HIV-1 uncoating. *Retrovirology.* 17 nov 2010;7:96.
- Arias JF, Heyer LN, von Bredow B, Weisgrau KL, Moldt B, Burton DR, et al. Tetherin antagonism by Vpu protects HIV-infected cells from antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity. *Proc Natl Acad Sci USA.* 29 avr 2014;111(17):6425-30.
- Ariën KK, Abraha A, Quiñones-Mateu ME, Kestens L, Vanham G, Arts EJ. The replicative fitness of primary human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) group M, HIV-1 group O, and HIV-2 isolates. *J Virol.* juill 2005;79(14):8979-90.
- Ariën KK, Gali Y, El-Abdellati A, Heyndrickx L, Janssens W, Vanham G. Replicative fitness of CCR5-using and CXCR4-using human immunodeficiency virus type 1 biological clones. *Virology.* 30 mars 2006;347(1):65-74.
- Armbruster C, Stiegler GM, Vcelar BA, Jäger W, Köller U, Jilch R, et al. Passive immunization with the anti-HIV-1 human monoclonal antibody (hMAb) 4E10 and the hMAb combination 4E10/2F5/2G12. *J Antimicrob Chemother.* nov 2004;54(5):915-20.
- Arnaout RA, Lloyd AL, O'Brien TR, Goedert JJ, Leonard JM, Nowak MA. A simple relationship between viral load and survival time in HIV-1 infection. *Proc Natl Acad Sci USA.* 28 sept 1999;96(20):11549-53.
- Arpin-André C, Laverdure S, Barbeau B, Gross A, Mesnard J-M. Construction of a reporter vector for analysis of bidirectional transcriptional activity of retrovirus LTR. *Plasmid.* juill 2014;74:45-51.
- Arrighi J-F, Pion M, Garcia E, Escola J-M, van Kooyk Y, Geijtenbeek TB, et al. DC-SIGN-mediated infectious synapse formation enhances X4 HIV-1 transmission from dendritic cells to T cells. *J Exp Med.* 15 nov 2004;200(10):1279-88.
- Arya SK, Gallo RC. Three novel genes of human T-lymphotropic virus type III: immune reactivity of their products with sera from acquired immune deficiency syndrome patients. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 1 avr 1986;83(7):2209-13.
- Asjö B, Morfeldt-Månson L, Albert J, Biberfeld G, Karlsson A, Lidman K, et al. Replicative capacity of human immunodeficiency virus from patients with varying severity of HIV infection. *Lancet.* 20 sept 1986;2(8508):660-2.
- Avettand-Fenoel V, Damond F, Gueudin M, Matheron S, Mélard A, Collin G, et al. New sensitive one-step real-time duplex PCR method for group A and B HIV-2 RNA load. *J Clin Microbiol.* août 2014;52(8):3017-22.
- Ayinde D, Bruel T, Cardinaud S, Porrot F, Prado JG, Moris A, et al. SAMHD1 Limits HIV-1 Antigen Presentation by Monocyte-Derived Dendritic Cells. *J Virol.* juill 2015;89(14):6994-7006.

- Bánki Z, Posch W, Ejaz A, Oberhauser V, Willey S, Gassner C, et al. Complement as an Endogenous Adjuvant for Dendritic Cell-Mediated Induction of Retrovirus-Specific CTLs. *PLoS Pathog.* 2010 Apr 29;6(4):e1000891.
- Bansal A, Carlson J, Yan J, Akinkunle OT, Schaefer M, Sabbaj S, et al. CD8 T cell response and evolutionary pressure to HIV-1 cryptic epitopes derived from antisense transcription. *The Journal of Experimental Medicine.* 18 janv 2010;207(1):51-9.
- Barbeau, Mesnard. Does chronic infection in retroviruses have a sense ? *Trends Microbiol.* juin 2015;23(6):367-75.
- Barlow KL, Ajao AO, Clewley JP. Characterization of a novel simian immunodeficiency virus (SIVmonNG1) genome sequence from a mona monkey (*Cercopithecus mona*). *J Virol.* juin 2003;77(12):6879-88.
- Barouch DH, Deeks SG. Immunologic strategies for HIV-1 remission and eradication. *Science.* 11 juill 2014;345(6193):169-74.
- Barrell BG, Air GM, Hutchison CA. Overlapping genes in bacteriophage phiX174. *Nature.* 4 nov 1976;264(5581):34-41.
- Barré-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F, Nugeyre MT, Chamaret S, Gruest J, et al. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science.* 20 mai 1983;220(4599):868-71.
- Bautista-Amorocho H, Castellanos-Domínguez YZ, Rodríguez-Villamizar LA, Velandia-Cruz SA, Becerra-Peña JA, Farfán-García AE. Epidemiology, risk factors and genotypes of HBV in HIV-infected patients in the northeast region of Colombia: high prevalence of occult hepatitis B and F3 subgenotype dominance. *PLoS ONE.* 2014;9(12):e114272.
- Baxter AE, Niessl J, Fromentin R, Richard J, Porichis F, Charlebois R, et al. Single-Cell Characterization of Viral Translation-Competent Reservoirs in HIV-Infected Individuals. *Cell Host Microbe.* 14 sept 2016;20(3):368-80.
- Becquart P, Hocini H, Lévy M, Sèpou A, Kazatchkine MD, Bélec L. Secretory Anti-Human Immunodeficiency Virus (HIV) Antibodies in Colostrum and Breast Milk Are Not a Major Determinant of the Protection of Early Postnatal Transmission of HIV. *J Infect Dis.* 1 févr 2000;181(2):532-9.
- Bego MG, Côté É, Aschman N, Mercier J, Weissenhorn W, Cohen ÉA. Vpu Exploits the Cross-Talk between BST2 and the ILT7 Receptor to Suppress Anti-HIV-1 Responses by Plasmacytoid Dendritic Cells. *PLOS Pathogens.* 14 juill 2015;11(7):e1005024.
- Beignon A-S, McKenna K, Skoberne M, Manches O, DaSilva I, Kavanagh DG, et al. Endocytosis of HIV-1 activates plasmacytoid dendritic cells via Toll-like receptor-viral RNA interactions. *J Clin Invest.* nov 2005;115(11):3265-75.
- Beiter T, Reich E, Weigert C, Niess AM, Simon P. Sense or antisense? False priming reverse transcription controls are required for determining sequence orientation by reverse transcription-PCR. *Anal Biochem.* 15 oct 2007;369(2):258-61.
- Bélec L, Bouquety JC, Georges AJ, Siopathis MR, Martin PM. Antibodies to human immunodeficiency virus in the breast milk of healthy, seropositive women. *Pediatrics.* juin 1990;85(6):1022-6.

- Belrose G, Gross A, Olindo S, Lézin A, Dueymes M, Komla-Soukha I, et al. Effects of valproate on Tax and HBZ expression in HTLV-1 and HAM/TSP T lymphocytes. *Blood*. 1 sept 2011;118(9):2483-91.
- Belshaw R, Pybus OG, Rambaut A. The evolution of genome compression and genomic novelty in RNA viruses. *Genome Res*. oct 2007;17(10):1496-504.
- Berger CT, Carlson JM, Brumme CJ, Hartman KL, Brumme ZL, Henry LM, et al. Viral adaptation to immune selection pressure by HLA class I-restricted CTL responses targeting epitopes in HIV frameshift sequences. *J Exp Med*. 18 janv 2010;207(1):61-75.
- Berger CT, Llano A, Carlson JM, Brumme ZL, Brockman MA, Cedeño S, et al. Immune Screening Identifies Novel T Cell Targets Encoded by Antisense Reading Frames of HIV-1. Doms RW, éditeur. *Journal of Virology*. 1 avr 2015;89(7):4015-9.
- Bertsch C, Cluet D, Beyer C, Gloeckler L, Cecile A, Gut JP, et al. Properties of a chimeric simian-human immunodeficiency virus expressing an hybrid HIV-1 Nef/SIVmac Nef protein. *Arch Virol*. oct 2002;147(10):1963-75.
- Bet A, Maze E, Bansal A, Sterrett S, Gross A, Graff-Dubois S, et al. The HIV-1 Antisense Protein (ASP) induces CD8 T cell responses during chronic infection. *Retrovirology*. 2015;12(1):15.
- Betts MR. HIV nonprogressors preferentially maintain highly functional HIV-specific CD8+ T cells. *Blood*. 15 juin 2006;107(12):4781-9.
- Beyrer C, Birx DL, Bekker L-G, Barré-Sinoussi F, Cahn P, Dybul MR, et al. The Vancouver Consensus: antiretroviral medicines, medical evidence, and political will. *Lancet*. 8 août 2015;386(9993):505-7.
- Biberfeld P, Chayt KJ, Marselle LM, Biberfeld G, Gallo RC, Harper ME. HTLV-III expression in infected lymph nodes and relevance to pathogenesis of lymphadenopathy. *Am J Pathol*. déc 1986;125(3):436-42.
- Blanchet F, Moris A, Mitchell JP, Piguet V. A look at HIV journey: from dendritic cells to infection spread in CD4+ T cells. *Curr Opin HIV AIDS*. sept 2011;6(5):391-7.
- Blankson JN, Bailey JR, Thayil S, Yang H-C, Lassen K, Lai J, et al. Isolation and Characterization of Replication-Competent Human Immunodeficiency Virus Type 1 from a Subset of Elite Suppressors. *Journal of Virology*. 1 mars 2007;81(5):2508-18.
- Bobardt MD, Chatterji U, Selvarajah S, Van der Schueren B, David G, Kahn B, et al. Cell-free human immunodeficiency virus type 1 transcytosis through primary genital epithelial cells. *J Virol*. janv 2007;81(1):395-405.
- Bomsel M. Transcytosis of infectious human immunodeficiency virus across a tight human epithelial cell line barrier. *Nat Med*. janv 1997;3(1):42-7.
- Borel S, Espert L, Biard-Piechaczyk M. Macroautophagy Regulation during HIV-1 Infection of CD4+ T Cells and Macrophages. *Front Immunol*. 2012;3:97.
- Borel S, Robert-Hebmann V, Alfaisal J, Jain A, Faure M, Espert L, et al. HIV-1 viral infectivity factor interacts with microtubule-associated protein light chain 3 and inhibits autophagy. *AIDS*. 28 janv 2015;29(3):275-86.

- Borrow P, Lewicki H, Hahn BH, Shaw GM, Oldstone MB. Virus-specific CD8+ cytotoxic T-lymphocyte activity associated with control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Virol.* sept 1994;68(9):6103-10.
- Borrow P, Lewicki H, Wei X, Horwitz MS, Peffer N, Meyers H, et al. Antiviral pressure exerted by HIV-1-specific cytotoxic T lymphocytes (CTLs) during primary infection demonstrated by rapid selection of CTL escape virus. *Nat Med.* févr 1997;3(2):205-11.
- Bourara K, Liegler TJ, Grant RM. Target cell APOBEC3C can induce limited G-to-A mutation in HIV-1. *PLoS Pathog.* 26 oct 2007;3(10):1477-85.
- Bracq L, Xie M, Benichou S, Bouchet J. Mechanisms for Cell-to-Cell Transmission of HIV-1. *Front Immunol.* 2018 Feb 19;9:260.
- Breastfeeding and HIV International Transmission Study Group, Coutoudis A, Dabis F, Fawzi W, Gaillard P, Haverkamp G, et al. Late postnatal transmission of HIV-1 in breast-fed children: an individual patient data meta-analysis. *J Infect Dis.* 15 juin 2004;189(12):2154-66.
- Brenchley JM, Price DA, Douek DC. HIV disease: fallout from a mucosal catastrophe? *Nat Immunol.* mars 2006;7(3):235-9.
- Brenchley JM, Schacker TW, Ruff LE, Price DA, Taylor JH, Beilman GJ, et al. CD4+ T cell depletion during all stages of HIV disease occurs predominantly in the gastrointestinal tract. *J Exp Med.* 20 sept 2004;200(6):749-59.
- Briquet S, Richardson J, Vanhée-Brossollet C, Vaquero C. Natural antisense transcripts are detected in different cell lines and tissues of cats infected with feline immunodeficiency virus. *Gene.* 18 avr 2001;267(2):157-64.
- Briquet S, Vaquero C. Immunolocalization Studies of an Antisense Protein in HIV-1-Infected Cells and Viral Particles. *Virology.* janv 2002;292(2):177-84.
- Bruel T, Schwartz O. Markers of the HIV-1 reservoir: facts and controversies. *Current Opinion in HIV and AIDS.* mai 2018;1.
- Bruner KM, Murray AJ, Pollack RA, Soliman MG, Laskey SB, Capoferri AA, et al. Defective proviruses rapidly accumulate during acute HIV-1 infection. *Nat Med.* 2016;22(9):1043-9.
- Buchbinder SP, Katz MH, Hessel NA, O'Malley PM, Holmberg SD. Long-term HIV-1 infection without immunologic progression. *AIDS.* août 1994;8(8):1123-8.
- Bui JK, Sobolewski MD, Keele BF, Spindler J, Musick A, Wiegand A, et al. Proviruses with identical sequences comprise a large fraction of the replication-competent HIV reservoir. *PLoS Pathog.* 2017;13(3):e1006283.
- Bukrinsky MI, Etkin AF. Plus Strand of the HIV Provirus DNA Is Expressed at Early Stages of Infection. *AIDS Research and Human Retroviruses.* avr 1990;6(4):425-6.
- Bullock TN, Eisenlohr LC. Ribosomal scanning past the primary initiation codon as a mechanism for expression of CTL epitopes encoded in alternative reading frames. *J Exp Med.* 1 oct 1996;184(4):1319-29.

- Burbelo PD, Bayat A, Rhodes CS, Hoh R, Martin JN, Fromentin R, et al. HIV antibody characterization as a method to quantify reservoir size during curative interventions. *J Infect Dis.* 15 mai 2014;209(10):1613-7.
- Burbelo PD, Ching KH, Klimavicz CM, Iadarola MJ. Antibody Profiling by Luciferase Immunoprecipitation Systems (LIPS). *J Vis Exp.* 2009 Oct 7;(32).
- Burbelo PD, Ching KH, Mattson TL, Light JS, Bishop LR, Kovacs JA. Rapid antibody quantification and generation of whole proteome antibody response profiles using LIPS (luciferase immunoprecipitation systems). *Biochem Biophys Res Commun.* 26 janv 2007;352(4):889-95.
- Burbelo PD, Goldman R, Mattson TL. A simplified immunoprecipitation method for quantitatively measuring antibody responses in clinical sera samples by using mammalian-produced Renilla luciferase-antigen fusion proteins. *BMC Biotechnol.* 18 août 2005;5:22.
- Burniston MT, Cimarelli A, Colgan J, Curtis SP, Luban J. Human Immunodeficiency Virus Type 1 Gag Polyprotein Multimerization Requires the Nucleocapsid Domain and RNA and Is Promoted by the Capsid-Dimer Interface and the Basic Region of Matrix Protein. *J Virol.* oct 1999;73(10):8527-40.
- Buzon MJ, Martin-Gayo E, Pereyra F, Ouyang Z, Sun H, Li JZ, et al. Long-term antiretroviral treatment initiated at primary HIV-1 infection affects the size, composition, and decay kinetics of the reservoir of HIV-1-infected CD4 T cells. *J Virol.* 1 sept 2014;88(17):10056-65.
- Cahn P, Andrade-Villanueva J, Arribas JR, Gatell JM, Lama JR, Norton M, et al. Dual therapy with lopinavir and ritonavir plus lamivudine versus triple therapy with lopinavir and ritonavir plus two nucleoside reverse transcriptase inhibitors in antiretroviral-therapy-naïve adults with HIV-1 infection: 48 week results of the randomised, open label, non-inferiority GARDEL trial. *Lancet Infect Dis.* juill 2014;14(7):572-80.
- Callen BP, Shearwin KE, Egan JB. Transcriptional interference between convergent promoters caused by elongation over the promoter. *Mol Cell.* 4 juin 2004;14(5):647-56.
- Cardinaud S, Bouziat R, Rohrlich P-S, Tourdot S, Weiss L, Langlade-Demoyen P, et al. Design of a HIV-1-derived HLA-B07.02-restricted polyepitope construct. *AIDS.* 24 sept 2009;23(15):1945-54.
- Cardinaud S, Consiglieri G, Bouziat R, Urrutia A, Graff-Dubois S, Fourati S, et al. CTL escape mediated by proteasomal destruction of an HIV-1 cryptic epitope. *PLoS Pathog.* mai 2011;7(5):e1002049.
- Cardinaud S, Moris A, Février M, Rohrlich P-S, Weiss L, Langlade-Demoyen P, et al. Identification of cryptic MHC I-restricted epitopes encoded by HIV-1 alternative reading frames. *J Exp Med.* 19 avr 2004;199(8):1053-63.
- Carmichael C. Prevention and treatment of common HIV-associated opportunistic complications. *Prim Care.* sept 1997;24(3):561-74.
- Carr JM, Davis AJ, Coolen C, Cheney K, Burrell CJ, Li P. Vif-deficient HIV reverse transcription complexes (RTCs) are subject to structural changes and mutation of RTC-associated reverse transcription products. *Virology.* 20 juill 2006;351(1):80-91.
- Casartelli N, Guivel-Benhassine F, Bouziat R, Brandler S, Schwartz O, Moris A. The antiviral factor APOBEC3G improves CTL recognition of cultured HIV-infected T cells. *J Exp Med.* 18 janv 2010;207(1):39-49.

- Cassan E, Arigon-Chifolleau A-M, Mesnard J-M, Gross A, Gascuel O. Concomitant emergence of the antisense protein gene of HIV-1 and of the pandemic. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 11 oct 2016;113(41):11537-42.
- Cavanagh M-H, Landry S, Audet B, Arpin-André C, Hivin P, Paré M-È, et al. HTLV-I antisense transcripts initiating in the 3'LTR are alternatively spliced and polyadenylated. *Retrovirology*. 2 mars 2006;3:15.
- Centers for Disease Control (CDC). Pneumocystis pneumonia--Los Angeles. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 5 juin 1981;30(21):250-2.
- Centers for Disease Control (CDC). Update on acquired immune deficiency syndrome (AIDS)--United States. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 24 sept 1982;31(37):507-8, 513-4.
- Cerf-Bensussan N, Guy-Grand D. Intestinal intraepithelial lymphocytes. *Gastroenterol Clin North Am*. sept 1991;20(3):549-76.
- Champiat S, Raposo RAS, Maness NJ, Lehman JL, Purtell SE, Hasenkrug AM, et al. Influence of HAART on Alternative Reading Frame Immune Responses over the Course of HIV-1 Infection. *PLOS ONE*. 29 juin 2012;7(6):e39311.
- Chanda PK1, Ghayeb J, Wong-Staal F. Nonrandom distribution of antibodies to the TRS protein of human immunodeficiency virus in infected people with different clinical status. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 1988 Feb;4(1):11-6.
- Chaudhry A, Verghese DA, Das SR, Jameel S, George A, Bal V, et al. HIV-1 Nef promotes endocytosis of cell surface MHC class II molecules via a constitutive pathway. *J Immunol*. 15 août 2009;183(4):2415-24.
- Chéret A, Nembot G, Mélard A, Lascoux C, Slama L, Mialhes P, 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*. avr 2015;15(4):387-96.
- Chirico N, Vianelli A, Belshaw R. Why genes overlap in viruses. *Proc Biol Sci*. 22 déc 2010;277(1701):3809-17.
- 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*. août 2009;15(8):893-900.
- Chopard C, Tong PBV, Tóth P, Schatz M, Yezid H, Debaisieux S, et al. Cyclophilin A enables specific HIV-1 Tat palmitoylation and accumulation in uninfected cells. *Nat Commun*. 2018 Jun 8;9(1):2251.
- Chougui G, Munir-Matloob S, Matkovic R, Martin MM, Morel M, Lahouassa H, et al. HIV-2/SIV viral protein X counteracts HUSH repressor complex. *Nat Microbiol*. 2018;3(8):891-7.
- Chouquet C, Autran B, Gomard E, Bouley J-M, Calvez V, Katlama C, et al. Correlation between breadth of memory HIV-specific cytotoxic T cells, viral load and disease progression in HIV infection. *AIDS*. 6 déc 2002;16(18):2399-407.

- Chun TW, Engel D, Berrey MM, Shea T, Corey L, Fauci AS. Early establishment of a pool of latently infected, resting CD4(+) T cells during primary HIV-1 infection. *Proc Natl Acad Sci USA*. 21 juill 1998;95(15):8869-73.
- Chun TW, Finzi D, Margolick J, Chadwick K, Schwartz D, Siliciano RF. In vivo fate of HIV-1-infected T cells: quantitative analysis of the transition to stable latency. *Nat Med*. déc 1995;1(12):1284-90.
- Clavel F, Guétard D, Brun-Vézinet F, Chamaret S, Rey MA, Santos-Ferreira MO, et al. Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS. *Science*. 18 juill 1986;233(4761):343-6.
- Clayton KL, Garcia JV, Clements JE, Walker BD. HIV Infection of Macrophages: Implications for Pathogenesis and Cure. *Pathog Immun*. 24 mai 2017;2(2):179-92.
- Clerc I, Hivin P, Rubbo P-A, Lemasson I, Barbeau B, Mesnard J-M. Propensity for HBZ-SP1 isoform of HTLV-I to inhibit c-Jun activity correlates with sequestration of c-Jun into nuclear bodies rather than inhibition of its DNA-binding activity. *Virology*. 1 sept 2009;391(2):195-202.
- Clerc I, Laverdure S, Torresilla C, Landry S, Borel S, Vargas A, et al. Polarized expression of the membrane ASP protein derived from HIV-1 antisense transcription in T cells. *Retrovirology*. 2011;8(1):74.
- Clerc I, Polakowski N, André-Arpin C, Cook P, Barbeau B, Mesnard J-M, et al. An interaction between the human T cell leukemia virus type 1 basic leucine zipper factor (HBZ) and the KIX domain of p300/CBP contributes to the down-regulation of tax-dependent viral transcription by HBZ. *J Biol Chem*. 29 août 2008;283(35):23903-13.
- Clouse KA, Powell D, Washington I, Poli G, Strebel K, Farrar W, et al. Monokine regulation of human immunodeficiency virus-1 expression in a chronically infected human T cell clone. *J Immunol*. 15 janv 1989;142(2):431-8.
- Cocka LJ, Bates P. Identification of alternatively translated Tetherin isoforms with differing antiviral and signaling activities. *PLoS Pathog*. sept 2012;8(9):e1002931.
- Cohen EA, Dehni G, Sodroski JG, Haseltine WA. Human immunodeficiency virus vpr product is a virion-associated regulatory protein. *J Virol*. juin 1990;64(6):3097-9.
- Cohen EA, Terwilliger EF, Sodroski JG, Haseltine WA. Identification of a protein encoded by the vpu gene of HIV-1. *Nature*. août 1988;334(6182):532-4.
- Cohn LB, Silva IT, Oliveira TY, Rosales RA, Parrish EH, Learn GH, et al. HIV-1 integration landscape during latent and active infection. *Cell*. 29 janv 2015;160(3):420-32.
- Collier AC, Coombs RW, Schoenfeld DA, Bassett RL, Timpone J, Baruch A, et al. Treatment of human immunodeficiency virus infection with saquinavir, zidovudine, and zalcitabine. AIDS Clinical Trials Group. *N Engl J Med*. 18 avr 1996;334(16):1011-7.
- Colomer-Lluch M, Ruiz A, Moris A, Prado JG. Restriction Factors: From Intrinsic Viral Restriction to Shaping Cellular Immunity Against HIV-1. *Front Immunol*. 2018;9:2876.
- Connor. Vpr Is Required for Efficient Replication of Human Immunodeficiency Virus Type-1 in Mononuclear Phagocytes. *Virology*. 1995;206(2):935-44.

- Coulon P-G, Richetta C, Rouers A, Blanchet FP, Urrutia A, Guerbois M, et al. HIV-Infected Dendritic Cells Present Endogenous MHC Class II-Restricted Antigens to HIV-Specific CD4+ T Cells. *J Immunol.* 15 2016;197(2):517-32.
- Cournaud V, Abela B, Pourrut X, Mpoudi-Ngole E, Loul S, Delaporte E, et al. Identification of a new simian immunodeficiency virus lineage with a vpu gene present among different cercopithecus monkeys (*C. mona*, *C. cephus*, and *C. nictitans*) from Cameroon. *J Virol.* déc 2003;77(23):12523-34.
- Cuevas JM, Geller R, Garijo R, López-Aldeguer J, Sanjuán R. Extremely High Mutation Rate of HIV-1 In Vivo. *PLoS Biol.* 2015 Sep 16;13(9):e1002251.
- Dagleish AG, Beverley PC, Clapham PR, Crawford DH, Greaves MF, Weiss RA. The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus. *Nature.* 20 janv 1984;312(5996):763-7.
- D'Aquila RT, Hughes MD, Johnson VA, Fischl MA, Sommadossi JP, Liou SH, et al. Nevirapine, zidovudine, and didanosine compared with zidovudine and didanosine in patients with HIV-1 infection. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. National Institute of Allergy and Infectious Diseases AIDS Clinical Trials Group Protocol 241 Investigators. *Ann Intern Med.* 15 juin 1996;124(12):1019-30.
- D'arc M, Ayouba A, Esteban A, Learn GH, Boué V, Liegeois F, et al. Origin of the HIV-1 group O epidemic in western lowland gorillas. *Proc Natl Acad Sci USA.* 17 mars 2015;112(11):E1343-1352.
- Day CL, Kaufmann DE, Kiepiela P, Brown JA, Moodley ES, Reddy S, et al. PD-1 expression on HIV-specific T cells is associated with T-cell exhaustion and disease progression. *Nature.* 21 sept 2006;443(7109):350-4.
- Dazza M-C, Ekwalinga M, Nende M, Shamamba KB, Bitshi P, Paraskevis D, et al. Characterization of a novel vpu-harboring simian immunodeficiency virus from a Dent's Mona monkey (*Cercopithecus mona denti*). *J Virol.* juill 2005;79(13):8560-71.
- Dean M, Carrington M, Winkler C, Huttley GA, Smith MW, Allikmets R, et al. Genetic restriction of HIV-1 infection and progression to AIDS by a deletion allele of the *CCR5* structural gene. Hemophilia Growth and Development Study, Multicenter AIDS Cohort Study, Multicenter Hemophilia Cohort Study, San Francisco City Cohort, ALIVE Study. *Science.* 27 sept 1996;273(5283):1856-62.
- Debaisieux S, Lachambre S, Gross A, Mettling C, Besteiro S, Yezid H, et al. HIV-1 Tat inhibits phagocytosis by preventing the recruitment of Cdc42 to the phagocytic cup. *Nat Commun.* 4 févr 2015;6:6211.
- Debaisieux S, Rayne F, Yezid H, Beaumelle B. The ins and outs of HIV-1 Tat. *Traffic.* mars 2012;13(3):355-63.
- Delagreverie HM, Grude M, Lambert-Niclot S, Nere M-L, Jadand C, Leport C, et al. Anti-gp41 antibody levels reflect HIV viral suppression and cellular reservoir in long-term antiretroviral-treated trial participants. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* 1 mai 2019;74(5):1389-94.
- Delaugerre C, Antoni G, Mahjoub N, Pialoux G, Cua E, Pasquet A, et al. Assessment of HIV Screening Tests for Use in Preexposure Prophylaxis Programs. *J Infect Dis.* 01 2017;216(3):382-6.

- Delaugerre C, De Oliveira F, Lascoux-Combe C, Plantier J-C, Simon F. HIV-1 group N: travelling beyond Cameroon. *Lancet*. 26 nov 2011;378(9806):1894.
- DeMaster LK, Liu X, VanBelzen DJ, Trinité B, Zheng L, Agosto LM, et al. A Subset of CD4/CD8 Double-Negative T Cells Expresses HIV Proteins in Patients on Antiretroviral Therapy. *J Virol*. 4 nov 2015;90(5):2165-79.
- Deng H, Liu R, Ellmeier W, Choe S, Unutmaz D, Burkhart M, et al. Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1. *Nature*. 20 juin 1996;381(6584):661-6.
- Depatureaux A, Leoz M, De Oliveira F, Gueudin M, Damond F, Descamps D, et al. [Specific diagnosis and follow-up of HIV-1 group O infection: RES-O data]. *Med Mal Infect*. déc 2010;40(12):669-76.
- Descours B, Cribier A, Chable-Bessia C, Ayinde D, Rice G, Crow Y, et al. SAMHD1 restricts HIV-1 reverse transcription in quiescent CD4+T-cells. *Retrovirology*. 23 oct 2012;9(1):87.
- Descours B, Petitjean G, López-Zaragoza J-L, Bruel T, Raffel R, Psomas C, et al. CD32a is a marker of a CD4 T-cell HIV reservoir harbouring replication-competent proviruses. *Nature*. mars 2017;543(7646):564-7.
- Dettenhofer M, Cen S, Carlson BA, Kleiman L, Yu XF. Association of human immunodeficiency virus type 1 Vif with RNA and its role in reverse transcription. *J Virol*. oct 2000;74(19):8938-45.
- Di Marzio P, Choe S, Ebright M, Knoblauch R, Landau NR. Mutational analysis of cell cycle arrest, nuclear localization and virion packaging of human immunodeficiency virus type 1 Vpr. *J Virol*. déc 1995;69(12):7909-16.
- Di Nunzio F, Danckaert A, Fricke T, Perez P, Fernandez J, Perret E, et al. Human nucleoporins promote HIV-1 docking at the nuclear pore, nuclear import and integration. *PLoS ONE*. 2012;7(9):e46037.
- Didigu CA, Doms RW. Novel Approaches to Inhibit HIV Entry. *Viruses*. févr 2012;4(2):309-24.
- Dinges WL, Richardt J, Friedrich D, Jalbert E, Liu Y, Stevens CE, et al. Virus-specific CD8+ T-cell responses better define HIV disease progression than HLA genotype. *J Virol*. mai 2010;84(9):4461-8.
- Dismuke DJ, Aiken C. Evidence for a functional link between uncoating of the human immunodeficiency virus type 1 core and nuclear import of the viral preintegration complex. *J Virol*. avr 2006;80(8):3712-20.
- Doitsh G, Cavrois M, Lassen KG, Zepeda O, Yang Z, Santiago ML, et al. Abortive HIV infection mediates CD4 T cell depletion and inflammation in human lymphoid tissue. *Cell*. 24 nov 2010;143(5):789-801.
- Duda A, Lee-Turner L, Fox J, Robinson N, Dustan S, Kaye S, et al. HLA-Associated Clinical Progression Correlates with Epitope Reversion Rates in Early Human Immunodeficiency Virus Infection. *J Virol*. févr 2009;83(3):1228-39.
- Duncombe C, Kerr SJ, Ruxrungtham K, Dore GJ, Law MG, Emery S, et al. HIV disease progression in a patient cohort treated via a clinical research network in a resource limited setting. *AIDS*. 28 janv 2005;19(2):169-78.

- Duprat C, Mohammed Z, Datta P, Stackiw W, Ndinya-Achola JO, Kreiss JK, et al. Human immunodeficiency virus type 1 IgA antibody in breast milk and serum. *Pediatr Infect Dis J*. juill 1994;13(7):603-8.
- Durkin K, Rosewick N, Artesi M, Hahaut V, Griebel P, Arsic N, et al. Characterization of novel Bovine Leukemia Virus (BLV) antisense transcripts by deep sequencing reveals constitutive expression in tumors and transcriptional interaction with viral microRNAs. *Retrovirology*. 03 2016;13(1):33.
- Enose-Akahata Y, Abrams A, Massoud R, Bialuk I, Johnson KR, Green PL, et al. Humoral immune response to HTLV-1 basic leucine zipper factor (HBZ) in HTLV-1-infected individuals. *Retrovirology*. 2013;10(1):19.
- Espert L, Denizot M, Grimaldi M, Robert-Hebmann V, Gay B, Varbanov M, et al. Autophagy is involved in T cell death after binding of HIV-1 envelope proteins to CXCR4. *J Clin Invest*. août 2006;116(8):2161-72.
- Etienne L, Eymard-Duvernay S, Aghokeng A, Butel C, Monleau M, Peeters M. Single real-time reverse transcription-PCR assay for detection and quantification of genetically diverse HIV-1, SIVcpz, and SIVgor strains. *J Clin Microbiol*. mars 2013a;51(3):787-98.
- Etienne L, Hahn BH, Sharp PM, Matsen FA, Emerman M. Gene loss and adaptation to hominids underlie the ancient origin of HIV-1. *Cell Host Microbe*. 17 juill 2013b;14(1):85-92.
- Etienne L, Peeters M. Origine du VIH, une réussite émergente. *Virologie*. 1 mai 2010;14(3):171-84.
- Faria NR, Rambaut A, Suchard MA, Baele G, Bedford T, Ward MJ, et al. HIV epidemiology. The early spread and epidemic ignition of HIV-1 in human populations. *Science*. 03 2014;346(6205):56-61.
- Favre D, Mold J, Hunt PW, Kanwar B, Loke P, Seu L, et al. Tryptophan catabolism by indoleamine 2,3-dioxygenase 1 alters the balance of TH17 to regulatory T cells in HIV disease. *Sci Transl Med*. 19 mai 2010;2(32):32ra36.
- Fellay J, Ge D, Shianna KV, Colombo S, Ledergerber B, Cirulli ET, et al. Common genetic variation and the control of HIV-1 in humans. *PLoS Genet*. déc 2009;5(12):e1000791.
- Fellner L, Bechtel N, Witting MA, Simon S, Schmitt-Kopplin P, Keim D, et al. Phenotype of htgA (mbiA), a recently evolved orphan gene of *Escherichia coli* and *Shigella*, completely overlapping in antisense to yaaW. *FEMS Microbiol Lett*. janv 2014;350(1):57-64.
- Felzien LK, Woffendin C, Hottiger MO, Subbramanian RA, Cohen EA, Nabel GJ. HIV transcriptional activation by the accessory protein, VPR, is mediated by the p300 co-activator. *Proc Natl Acad Sci USA*. 28 avr 1998;95(9):5281-6.
- Feng L, Lintula S, Huu Ho T, Anastasina M, Paju A, Haglund C, et al. Technique for strand-specific gene-expression analysis and monitoring of primer-independent cDNA synthesis in reverse transcription. *Biotechniques*. 2012 Apr;52(4):263-70.
- Feng Y, Zhang F, Lokey LK, Chastain JL, Lakkis L, Eberhart D, et al. Translational suppression by trinucleotide repeat expansion at FMR1. *Science*. 5 mai 1995;268(5211):731-4.

- Ferrucci A, Nonnemacher MR, Wigdahl B. Human Immunodeficiency Virus Viral Protein R as an Extracellular Protein in Neuropathogenesis. *Adv Virus Res.* 2011;81:165-99.
- Fiebig EW, Wright DJ, Rawal BD, Garrett PE, Schumacher RT, Peddada L, et al. Dynamics of HIV viremia and antibody seroconversion in plasma donors: implications for diagnosis and staging of primary HIV infection. *AIDS.* 5 sept 2003;17(13):1871-9.
- 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.* 14 nov 1997;278(5341):1295-300.
- Fiscus SA, Cheng B, Crowe SM, Demeter L, Jennings C, Miller V, et al. HIV-1 viral load assays for resource-limited settings. *PLoS Med.* oct 2006;3(10):e417.
- Fletcher CV, Staskus K, Wietgreffe SW, Rothenberger M, Reilly C, Chipman JG, et al. Persistent HIV-1 replication is associated with lower antiretroviral drug concentrations in lymphatic tissues. *Proc Natl Acad Sci USA.* 11 févr 2014;111(6):2307-12.
- Folks TM, Clouse KA, Justement J, Rabson A, Duh E, Kehrl JH, et al. Tumor necrosis factor alpha induces expression of human immunodeficiency virus in a chronically infected T-cell clone. *Proc Natl Acad Sci USA.* avr 1989;86(7):2365-8.
- Folks TM, Justement J, Kinter A, Dinarello CA, Fauci AS. Cytokine-induced expression of HIV-1 in a chronically infected promonocyte cell line. *Science.* 6 nov 1987;238(4828):800-2.
- Fouda GG, Yates NL, Pollara J, Shen X, Overman GR, Mahlokozera T, et al. HIV-Specific Functional Antibody Responses in Breast Milk Mirror Those in Plasma and Are Primarily Mediated by IgG Antibodies. *J Virol.* sept 2011;85(18):9555-67.
- Freed EO. HIV-1 assembly, release and maturation. *Nat Rev Microbiol.* août 2015;13(8):484-96.
- Freeman GJ, Wherry EJ, Ahmed R, Sharpe AH. Reinvigorating exhausted HIV-specific T cells via PD-1–PD-1 ligand blockade. *J Exp Med.* 2 oct 2006;203(10):2223-7.
- Fregoso OI, Emerman M. Activation of the DNA Damage Response Is a Conserved Function of HIV-1 and HIV-2 Vpr That Is Independent of SLX4 Recruitment. *MBio.* 13 2016;7(5).
- French MA, Tjiam MC, Abudulai LN, Fernandez S. Antiviral Functions of Human Immunodeficiency Virus Type 1 (HIV-1)-Specific IgG Antibodies: Effects of Antiretroviral Therapy and Implications for Therapeutic HIV-1 Vaccine Design. *Front Immunol.* 2017 Jul 4;8:780.
- Furuta RA, Ma G, Matsuoka M, Otani S, Matsukura H, Hirayama F. Reevaluation of confirmatory tests for human T-cell leukemia virus Type 1 using a luciferase immunoprecipitation system in blood donors. *Transfusion.* 2015;55(4):880-9.
- Gagneux-Brunon A, Nasri D, Terrasse R, Sauné K, Gagnieu M-C, Frésard A, et al. Persistent But Not Replicating HIV-1 Cell-Associated DNA in Semen of Long-Term ART Experienced Men. *Curr HIV Res.* 2016;14(4):316-23.
- Gagneux-Brunon A, Rochereau N, Botelho-Nevers E, Lucht F, Pozzetto B, Paul S, et al. Humoral responses against HIV in male genital tract: role in sexual transmission and perspectives for preventive strategies. *AIDS.* mai 2017;31(8):1055-64.

- Galão RP, Le Tortorec A, Pickering S, Kueck T, Neil SJD. Innate sensing of HIV-1 assembly by Tetherin induces NF κ B-dependent proinflammatory responses. *Cell Host Microbe*. 15 nov 2012;12(5):633-44.
- Garcia JV, Foster JL. Structural and functional correlates between HIV-1 and SIV Nef isolates. *Virology*. 15 déc 1996;226(2):161-6.
- Garrison KE, Champiat S, York VA, Agrawal AT, Kallas EG, Martin JN, et al. Transcriptional errors in human immunodeficiency virus type 1 generate targets for T-cell responses. *Clin Vaccine Immunol*. sept 2009;16(9):1369-71.
- Gartner S, Markovits P, Markovitz DM, Kaplan MH, Gallo RC, Popovic M. The role of mononuclear phagocytes in HTLV-III/LAV infection. *Science*. 11 juill 1986;233(4760):215-9.
- Gaudray G, Gachon F, Basbous J, Biard-Piechaczyk M, Devaux C, Mesnard J-M. The Complementary Strand of the Human T-Cell Leukemia Virus Type 1 RNA Genome Encodes a bZIP Transcription Factor That Down-Regulates Viral Transcription. *Journal of Virology*. 15 déc 2002;76(24):12813-22.
- Gaynor R. Cellular transcription factors involved in the regulation of HIV-1 gene expression. *AIDS*. avr 1992;6(4):347-63.
- Gazon H, Lemasson I, Polakowski N, Césaire R, Matsuoka M, Barbeau B, et al. Human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) bZIP factor requires cellular transcription factor JunD to upregulate HTLV-1 antisense transcription from the 3' long terminal repeat. *J Virol*. sept 2012;86(17):9070-8.
- Geijtenbeek TB, Kwon DS, Torensma R, van Vliet SJ, van Duijnhoven GC, Middel J, et al. DC-SIGN, a dendritic cell-specific HIV-1-binding protein that enhances trans-infection of T cells. *Cell*. 3 mars 2000;100(5):587-97.
- Gilbert MTP, Rambaut A, Wlasiuk G, Spira TJ, Pitchenik AE, Worobey M. The emergence of HIV/AIDS in the Americas and beyond. *Proc Natl Acad Sci USA*. 20 nov 2007;104(47):18566-70.
- Ginhoux F, Jung S. Monocytes and macrophages: developmental pathways and tissue homeostasis. *Nat Rev Immunol*. juin 2014;14(6):392-404.
- Goh WC, Rogel ME, Kinsey CM, Michael SF, Fultz PN, Nowak MA, et al. HIV-1 Vpr increases viral expression by manipulation of the cell cycle: a mechanism for selection of Vpr in vivo. *Nat Med*. janv 1998;4(1):65-71.
- Goonetilleke N, Liu MKP, Salazar-Gonzalez JF, Ferrari G, Giorgi E, Ganusov VV, et al. The first T cell response to transmitted/founder virus contributes to the control of acute viremia in HIV-1 infection. *J Exp Med*. 8 juin 2009;206(6):1253-72.
- Gottlieb GS, Hawes SE, Agne HD, Stern JE, Critchlow CW, Kiviat NB, et al. Lower levels of HIV RNA in semen in HIV-2 compared with HIV-1 infection: implications for differences in transmission. *AIDS*. 4 avr 2006;20(6):895-900.
- Göttlinger HG, Sodroski JG, Haseltine WA. Role of capsid precursor processing and myristoylation in morphogenesis and infectivity of human immunodeficiency virus type 1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. août 1989;86(15):5781-5.

- Goujard C, Bonarek M, Meyer L, Bonnet F, Chaix M-L, Deveau C, 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*. 1 mars 2006;42(5):709-15.
- Goujon C, Jarrosson-Wuillème L, Bernaud J, Rigal D, Darlix J-L, Cimorelli A. With a little help from a friend: increasing HIV transduction of monocyte-derived dendritic cells with virion-like particles of SIV(MAC). *Gene Ther*. juin 2006;13(12):991-4.
- Goujon C, Moncorgé O, Bauby H, Doyle T, Ward CC, Schaller T, et al. Human MX2 is an interferon-induced post-entry inhibitor of HIV-1 infection. *Nature*. 24 oct 2013;502(7472):559-62.
- Goulder P, Deeks SG. HIV control: Is getting there the same as staying there? Coyne CB, éditeur. *PLOS Pathogens*. 1 nov 2018;14(11):e1007222.
- Goulder PJ, Brander C, Tang Y, Tremblay C, Colbert RA, Addo MM, et al. Evolution and transmission of stable CTL escape mutations in HIV infection. *Nature*. 19 juill 2001;412(6844):334-8.
- Goulder PJ, Phillips RE, Colbert RA, McAdam S, Ogg G, Nowak MA, et al. Late escape from an immunodominant cytotoxic T-lymphocyte response associated with progression to AIDS. *Nat Med*. févr 1997;3(2):212-7.
- Graf EH, Pace MJ, Peterson BA, Lynch LJ, Chukwulebe SB, Mexas AM, et al. Gag-Positive Reservoir Cells Are Susceptible to HIV-Specific Cytotoxic T Lymphocyte Mediated Clearance In Vitro and Can Be Detected In Vivo. *PLoS One*. 2013 Aug 7;8(8):e71879.
- Grant RM, Lama JR, Anderson PL, McMahan V, Liu AY, Vargas L, et al. Preexposure Chemoprophylaxis for HIV Prevention in Men Who Have Sex with Men. *N Engl J Med*. 30 déc 2010;363(27):2587-99.
- Gray GE, Allen M, Moodie Z, Churchyard G, Bekker L-G, Nchabeleng M, et al. Safety and efficacy of the HVTN 503/Phambili study of a clade-B-based HIV-1 vaccine in South Africa: a double-blind, randomised, placebo-controlled test-of-concept phase 2b study. *Lancet Infect Dis*. juill 2011;11(7):507-15.
- Guadalupe M, Reay E, Sankaran S, Prindiville T, Flamm J, McNeil A, 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*. nov 2003;77(21):11708-17.
- Guichet E, Aghokeng A, Eymard-Duvernay S, Vidal N, Ayouba A, Mpoudi Ngole E, et al. Field evaluation of an open and polyvalent universal HIV-1/SIVcpz/SIVgor quantitative RT-PCR assay for HIV-1 viral load monitoring in comparison to Abbott RealTime HIV-1 in Cameroon. *J Virol Methods*. 2016;237:121-6.
- Gunji T, Kato N, Hijikata M, Hayashi K, Saitoh S, Shimotohno K. Specific detection of positive and negative stranded hepatitis C viral RNA using chemical RNA modification. *Arch Virol*. 1994;134(3-4):293-302.
- Günthard HF, Saag MS, Benson CA, del Rio C, Eron JJ, Gallant JE, et al. Antiretroviral Drugs for Treatment and Prevention of HIV Infection in Adults: 2016 Recommendations of the International Antiviral Society—USA Panel. *JAMA*. 12 juill 2016;316(2):191.

- Guttman M, Amit I, Garber M, French C, Lin MF, Feldser D, et al. Chromatin signature reveals over a thousand highly conserved large non-coding RNAs in mammals. *Nature*. 12 mars 2009;458(7235):223-7.
- Guy B, Kieny MP, Riviere Y, Le Peuch C, Dott K, Girard M, et al. HIV F/3' orf encodes a phosphorylated GTP-binding protein resembling an oncogene product. *Nature*. 19 nov 1987;330(6145):266-9.
- Hahn BH, Shaw GM, De Cock KM, Sharp PM. AIDS as a zoonosis: scientific and public health implications. *Science*. 28 janv 2000;287(5453):607-14.
- Halin M, Douceron E, Clerc I, Journo C, Ko NL, Landry S, et al. Human T-cell leukemia virus type 2 produces a spliced antisense transcript encoding a protein that lacks a classic bZIP domain but still inhibits Tax2-mediated transcription. *Blood*. 17 sept 2009;114(12):2427-38.
- Hall MP, Unch J, Binkowski BF, Valley MP, Butler BL, Wood MG, et al. Engineered Luciferase Reporter from a Deep Sea Shrimp Utilizing a Novel Imidazopyrazinone Substrate. *ACS Chemical Biology*. 16 nov 2012;7(11):1848-57.
- Halper-Stromberg A, Nussenzweig MC. Towards HIV-1 remission: potential roles for broadly neutralizing antibodies. *J Clin Invest*. févr 2016;126(2):415-23.
- Hammarskjöld ML, Heimer J, Hammarskjöld B, Sangwan I, Albert L, Rekosh D. Regulation of human immunodeficiency virus env expression by the rev gene product. *J Virol*. mai 1989;63(5):1959-66.
- Han Y, Lassen K, Monie D, Sedaghat AR, Shimoji S, Liu X, et al. Resting CD4+ T cells from human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-infected individuals carry integrated HIV-1 genomes within actively transcribed host genes. *J Virol*. juin 2004;78(12):6122-33.
- Hanson LA, Ahlstedt S, Andersson B, Cruz JR, Dahlgren U, Fällström SP, et al. The immune response of the mammary gland and its significance for the neonate. *Ann Allergy*. déc 1984;53(6 Pt 2):576-82.
- Hanson LA, Korotkova M, Lundin S, Håversen L, Silfverdal S-A, Mattsby-Baltzer I, et al. The transfer of immunity from mother to child. *Ann N Y Acad Sci*. avr 2003;987:199-206.
- Harris RS, Bishop KN, Sheehy AM, Craig HM, Petersen-Mahrt SK, Watt IN, et al. DNA deamination mediates innate immunity to retroviral infection. *Cell*. 13 juin 2003;113(6):803-9.
- Hatzioannou T, Perez-Caballero D, Yang A, Cowan S, Bieniasz PD. Retrovirus resistance factors Ref1 and Lv1 are species-specific variants of TRIM5 α . *Proc Natl Acad Sci U S A*. 20 juill 2004;101(29):10774-9.
- Hawes SE, Sow PS, Stern JE, Critchlow CW, Gottlieb GS, Kiviat NB. Lower levels of HIV-2 than HIV-1 in the female genital tract: correlates and longitudinal assessment of viral shedding. *AIDS*. 30 nov 2008;22(18):2517-25.
- Haynes BF, Moody MA, Liao H-X, Verkoczy L, Tomaras GD. B cell responses to HIV-1 infection and vaccination: pathways to preventing infection. *Trends Mol Med*. févr 2011;17(2):108-16.
- He Y, Vogelstein B, Velculescu VE, Papadopoulos N, Kinzler KW. The antisense transcriptomes of human cells. *Science*. 19 déc 2008;322(5909):1855-7.

- Hellerstein M, Hanley MB, Cesar D, Siler S, Papageorgopoulos C, Wieder E, et al. Directly measured kinetics of circulating T lymphocytes in normal and HIV-1-infected humans. *Nat Med.* janv 1999;5(1):83-9.
- Hemelaar J, Elangovan R, Yun J, Dickson-Tetteh L, Fleminger I, Kirtley S, et al. Global and regional molecular epidemiology of HIV-1, 1990-2015: a systematic review, global survey, and trend analysis. *Lancet Infect Dis.* févr 2019;19(2):143-55.
- Henklein P, Bruns K, Sherman MP, Tessmer U, Licha K, Kopp J, et al. Functional and structural characterization of synthetic HIV-1 Vpr that transduces cells, localizes to the nucleus, and induces G2 cell cycle arrest. *J Biol Chem.* 13 oct 2000;275(41):32016-26.
- Hirsch VM, Olmsted RA, Murphey-Corb M, Purcell RH, Johnson PR. An African primate lentivirus (SIVsm) closely related to HIV-2. *Nature.* 1 juin 1989;339(6223):389-92.
- Hivin P, Basbous J, Raymond F, Henaff D, Arpin-André C, Robert-Hebmann V, et al. The HBZ-SP1 isoform of human T-cell leukemia virus type I represses JunB activity by sequestration into nuclear bodies. *Retrovirology.* 16 févr 2007;4:14.
- Hivin P, Frédéric M, Arpin-André C, Basbous J, Gay B, Thébault S, et al. Nuclear localization of HTLV-I bZIP factor (HBZ) is mediated by three distinct motifs. *J Cell Sci.* 1 avr 2005;118(Pt 7):1355-62.
- Ho DD. Viral counts count in HIV infection. *Science.* 24 mai 1996;272(5265):1124-5.
- Ho O, Green WR. Alternative translational products and cryptic T cell epitopes: expecting the unexpected. *J Immunol.* 15 déc 2006;177(12):8283-9.
- Ho Y-C, Shan L, Hosmane NN, Wang J, Laskey SB, Rosenbloom DIS, et al. Replication-competent noninduced proviruses in the latent reservoir increase barrier to HIV-1 cure. *Cell.* 24 oct 2013;155(3):540-51.
- Hocqueloux L, Prazuck T, Avettand-Fenoel V, Lafeuillade A, Cardon B, Viard J-P, et al. Long-term immunovirologic control following antiretroviral therapy interruption in patients treated at the time of primary HIV-1 infection. *AIDS.* 19 juin 2010;24(10):1598-601.
- Hogan LE, Vasquez J, Hobbs KS, Hanhauser E, Aguilar-Rodriguez B, Hussien R, et al. Increased HIV-1 transcriptional activity and infectious burden in peripheral blood and gut-associated CD4+ T cells expressing CD30. *PLoS Pathog.* 2018;14(2):e1006856.
- Holl V, Peressin M, Decoville T, Schmidt S, Zolla-Pazner S, Aubertin A-M, et al. Nonneutralizing antibodies are able to inhibit human immunodeficiency virus type 1 replication in macrophages and immature dendritic cells. *J Virol.* juin 2006;80(12):6177-81.
- Honeycutt JB, Wahl A, Baker C, Spagnuolo RA, Foster J, Zakharova O, et al. Macrophages sustain HIV replication in vivo independently of T cells. *J Clin Invest.* 1 avr 2016;126(4):1353-66.
- Hoshino S, Sun B, Konishi M, Shimura M, Segawa T, Hagiwara Y, et al. Vpr in plasma of HIV type 1-positive patients is correlated with the HIV type 1 RNA titers. *AIDS Res Hum Retroviruses.* mars 2007;23(3):391-7.
- Hrecka K, Hao C, Gierszewska M, Swanson SK, Kesik-Brodacka M, Srivastava S, et al. Vpx relieves inhibition of HIV-1 infection of macrophages mediated by the SAMHD1 protein. *Nature.* 29 juin 2011;474(7353):658-61.

- Hrecka K, Swigut T, Schindler M, Kirchhoff F, Skowronski J. Nef proteins from diverse groups of primate lentiviruses downmodulate CXCR4 to inhibit migration to the chemokine stromal derived factor 1. *J Virol.* août 2005;79(16):10650-9.
- Huang KJ, Wooley DP. A new cell-based assay for measuring the forward mutation rate of HIV-1. *J Virol Methods.* mars 2005;124(1-2):95-104.
- Huang M, Orenstein JM, Martin MA, Freed EO. p6Gag is required for particle production from full-length human immunodeficiency virus type 1 molecular clones expressing protease. *J Virol.* nov 1995;69(11):6810-8.
- Huang W, Eshleman SH, Toma J, Fransen S, Stawiski E, Paxinos EE, et al. Coreceptor tropism in human immunodeficiency virus type 1 subtype D: high prevalence of CXCR4 tropism and heterogeneous composition of viral populations. *J Virol.* août 2007;81(15):7885-93.
- Hubert JB, Burgard M, Dussaix E, Tamalet C, Deveau C, Le Chenadec J, et al. Natural history of serum HIV-1 RNA levels in 330 patients with a known date of infection. The SEROCO Study Group. *AIDS.* 28 janv 2000;14(2):123-31.
- Huet T, Cheynier R, Meyerhans A, Roelants G, Wain-Hobson S. Genetic organization of a chimpanzee lentivirus related to HIV-1. *Nature.* 24 mai 1990;345(6273):356-9.
- Iglesias-Ussel M, Vandergeeten C, Marchionni L, Chomont N, Romerio F. High Levels of CD2 Expression Identify HIV-1 Latently Infected Resting Memory CD4+ T Cells in Virally Suppressed Subjects. *J Virol.* août 2013;87(16):9148-58.
- Iwabu Y, Fujita H, Tanaka Y, Sata T, Tokunaga K. Direct internalization of cell-surface BST-2/tetherin by the HIV-1 accessory protein Vpu. *Commun Integr Biol.* 2010;3(4):366-9.
- Ji J, Cloyd MW. HIV-1 binding to CD4 on CD4+CD25+ regulatory T cells enhances their suppressive function and induces them to home to, and accumulate in, peripheral and mucosal lymphoid tissues: an additional mechanism of immunosuppression. *Int Immunol.* mars 2009;21(3):283-94.
- Jia B, Serra-Moreno R, Neidermyer W, Rahmberg A, Mackey J, Fofana IB, et al. Species-specific activity of SIV Nef and HIV-1 Vpu in overcoming restriction by tetherin/BST2. *PLoS Pathog.* mai 2009;5(5):e1000429.
- Jones GJ, Barsby NL, Cohen EA, Holden J, Harris K, Dickie P, et al. HIV-1 Vpr causes neuronal apoptosis and in vivo neurodegeneration. *J Neurosci.* 4 avr 2007;27(14):3703-11.
- Joseph JC, Baker C, Sprang ML, Bermes EW. Changes in plasma proteins during pregnancy. *Ann Clin Lab Sci.* avr 1978;8(2):130-41.
- Joseph SB, Arrildt KT, Sturdevant CB, Swanstrom R. HIV-1 target cells in the CNS. *J Neurovirol.* juin 2015a;21(3):276-89.
- Joseph SB, Swanstrom R, Kashuba ADM, Cohen MS. Bottlenecks in HIV-1 transmission: insights from the study of founder viruses. *Nat Rev Microbiol.* juill 2015b;13(7):414-25.
- Junqueira DM, Almeida SE de M. HIV-1 subtype B: Traces of a pandemic. *Virology.* 1 août 2016;495:173-84.

- Kagone TS, Hien H, Meda N, Diagbougba PS, Sawadogo A, Drabo J, et al. Characterization of HIV-1 genotypes and antiretroviral drug-resistance mutations among patients in Burkina Faso. *Pak J Biol Sci.* 15 mars 2011;14(6):392-8.
- Kaleebu P, French N, Mahe C, Yirrell D, Watera C, Lyagoba F, et al. Effect of human immunodeficiency virus (HIV) type 1 envelope subtypes A and D on disease progression in a large cohort of HIV-1-positive persons in Uganda. *J Infect Dis.* 1 mai 2002;185(9):1244-50.
- Kamata M, Nitahara-Kasahara Y, Miyamoto Y, Yoneda Y, Aida Y. Importin-alpha promotes passage through the nuclear pore complex of human immunodeficiency virus type 1 Vpr. *J Virol.* mars 2005;79(6):3557-64.
- Kan NC, Franchini G, Wong-Staal F, DuBois GC, Robey WG, Lautenberger JA, Papas TS. Identification of HTLV-III/LAV sor gene product and detection of antibodies in human sera. *Science.* 1986 Mar 28;231(4745):1553-5.
- Kandathil AJ, Sugawara S, Balagopal A. Are T cells the only HIV-1 reservoir? *Retrovirology.* 20 déc 2016;13(1):86.
- Kao SY, Calman AF, Luciw PA, Peterlin BM. Anti-termination of transcription within the long terminal repeat of HIV-1 by tat gene product. *Nature.* 3 déc 1987;330(6147):489-93.
- Karn J, Stoltzfus CM. Transcriptional and Posttranscriptional Regulation of HIV-1 Gene Expression. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2012 Feb;2(2):a006916.
- Katayama S, Tomaru Y, Kasukawa T, Waki K, Nakanishi M, Nakamura M, et al. Antisense transcription in the mammalian transcriptome. *Science.* 2 sept 2005;309(5740):1564-6.
- Kawashima Y, Pfafferott K, Frater J, Matthews P, Payne R, Addo M, et al. Adaptation of HIV-1 to human leukocyte antigen class I. *Nature.* 2 avr 2009;458(7238):641-5.
- Keckesova Z, Ylinen LMJ, Towers GJ. The human and African green monkey TRIM5alpha genes encode Ref1 and Lv1 retroviral restriction factor activities. *Proc Natl Acad Sci USA.* 20 juill 2004;101(29):10780-5.
- Keele BF, Giorgi EE, Salazar-Gonzalez JF, Decker JM, Pham KT, Salazar MG, et al. Identification and characterization of transmitted and early founder virus envelopes in primary HIV-1 infection. *Proc Natl Acad Sci USA.* 27 mai 2008;105(21):7552-7.
- Keele BF, Van Heuverswyn F, Li Y, Bailes E, Takehisa J, Santiago ML, et al. Chimpanzee reservoirs of pandemic and nonpandemic HIV-1. *Science.* 28 juill 2006;313(5786):523-6.
- Keese PK, Gibbs A. Origins of genes: « big bang » or continuous creation? *PNAS.* 15 oct 1992;89(20):9489-93.
- Khalil AM, Guttman M, Huarte M, Garber M, Raj A, Rivea Morales D, et al. Many human large intergenic noncoding RNAs associate with chromatin-modifying complexes and affect gene expression. *Proc Natl Acad Sci USA.* 14 juill 2009;106(28):11667-72.
- Khan MA, Aberham C, Kao S, Akari H, Gorelick R, Bour S, et al. Human immunodeficiency virus type 1 Vif protein is packaged into the nucleoprotein complex through an interaction with viral genomic RNA. *J Virol.* août 2001;75(16):7252-65.

- Kiepiela P, Leslie AJ, Honeyborne I, Ramduth D, Thobakgale C, Chetty S, et al. Dominant influence of HLA-B in mediating the potential co-evolution of HIV and HLA. *Nature*. 9 déc 2004;432(7018):769-75.
- Kiepiela P, Ngumbela K, Thobakgale C, Ramduth D, Honeyborne I, Moodley E, et al. CD8+ T-cell responses to different HIV proteins have discordant associations with viral load. *Nature Medicine*. janv 2007;13(1):46-53.
- Killian MS, Norris PJ, Rawal BD, Lebedeva M, Hecht FM, Levy JA, et al. The Effects of Early Antiretroviral Therapy and Its Discontinuation on the HIV-Specific Antibody Response. *AIDS Research and Human Retroviruses*. juill 2006;22(7):640-7.
- Kim JH, Excler J-L, Michael NL. Lessons from the RV144 Thai Phase III HIV-1 Vaccine Trial and the Search for Correlates of Protection. *Annual Review of Medicine*. 14 janv 2015;66(1):423-37.
- Kim VN, Han J, Siomi MC. Biogenesis of small RNAs in animals. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 1 févr 2009;10:126.
- Klatt NR, Chomont N, Douek DC, Deeks SG. Immune activation and HIV persistence: Implications for curative approaches to HIV infection. *Immunol Rev*. juill 2013;254(1):326-42.
- Klaver B, Berkhout B. Comparison of 5' and 3' long terminal repeat promoter function in human immunodeficiency virus. *J Virol*. juin 1994;68(6):3830-40.
- Kobayashi-Ishihara M, Terahara K, Martinez JP, Yamagishi M, Iwabuchi R, Brander C, et al. HIV LTR-Driven Antisense RNA by Itself Has Regulatory Function and May Curtail Virus Reactivation From Latency. *Front Microbiol*. 2018 May 25;9:1066.
- Kobayashi-Ishihara M, Yamagishi M, Hara T, Matsuda Y, Takahashi R, Miyake A, et al. HIV-1-encoded antisense RNA suppresses viral replication for a prolonged period. *Retrovirology*. 2012;9(1):38.
- Kotake Y, Nakagawa T, Kitagawa K, Suzuki S, Liu N, Kitagawa M, et al. Long non-coding RNA ANRIL is required for the PRC2 recruitment to and silencing of p15(INK4B) tumor suppressor gene. *Oncogene*. 21 avr 2011;30(16):1956-62.
- Kovacs A, Al-Harhi L, Christensen S, Mack W, Cohen M, Landay A. CD8(+) T cell activation in women coinfecting with human immunodeficiency virus type 1 and hepatitis C virus. *J Infect Dis*. 15 mai 2008;197(10):1402-7.
- Krishnan L, Matreyek KA, Oztop I, Lee K, Tipper CH, Li X, et al. The requirement for cellular transportin 3 (TNPO3 or TRN-SR2) during infection maps to human immunodeficiency virus type 1 capsid and not integrase. *J Virol*. janv 2010;84(1):397-406.
- Kuhn L, Trabattoni D, Kankasa C, Sinkala M, Lissoni F, Ghosh M, et al. Hiv-specific secretory IgA in breast milk of HIV-positive mothers is not associated with protection against HIV transmission among breast-fed infants. *J Pediatr*. nov 2006;149(5):611-6.
- Kulkarni A, Kurle S, Shete A, Ghate M, Godbole S, Madhavi V, et al. Indian Long-term Non-Progressors Show Broad ADCC Responses with Preferential Recognition of V3 Region of Envelope and a Region from Tat Protein. *Front Immunol*. 2017 Jan 19;8:5.
- Kulkarni V, Ruprecht RM. Mucosal IgA Responses: Damaged in Established HIV Infection—Yet, Effective Weapon against HIV Transmission. *Front Immunol*. 2017 Nov 15;8:1581.

- Kuller LH, Tracy R, Belloso W, De Wit S, Drummond F, Lane HC, et al. Inflammatory and coagulation biomarkers and mortality in patients with HIV infection. *PLoS Med.* 21 oct 2008;5(10):e203.
- Kumar R, Qureshi H, Deshpande S, Bhattacharya J. Broadly neutralizing antibodies in HIV-1 treatment and prevention. *Ther Adv Vaccines Immunother.* 12 oct 2018;6(4):61-8.
- Kurochkina N, Guha U. SH3 domains: modules of protein–protein interactions. *Biophys Rev.* 20 juin 2012;5(1):29-39.
- Laguette N, Benichou S, Basmaciogullari S. Human Immunodeficiency Virus Type 1 Nef Incorporation into Virions Does Not Increase Infectivity. *J Virol.* janv 2009;83(2):1093-104.
- Laguette N, Brégnard C, Hue P, Basbous J, Yatim A, Larroque M, et al. Premature activation of the SLX4 complex by Vpr promotes G2/M arrest and escape from innate immune sensing. *Cell.* 16 janv 2014;156(1-2):134-45.
- Laguette N, Sobhian B, Casartelli N, Ringeard M, Chable-Bessia C, Ségéral E, et al. SAMHD1 is the dendritic- and myeloid-cell-specific HIV-1 restriction factor counteracted by Vpx. *Nature.* 25 mai 2011;474(7353):654-7.
- Lahaye X, Satoh T, Gentili M, Cerboni S, Conrad C, Hurbain I, et al. The capsids of HIV-1 and HIV-2 determine immune detection of the viral cDNA by the innate sensor cGAS in dendritic cells. *Immunity.* 12 déc 2013;39(6):1132-42.
- Lahouassa H, Daddacha W, Hofmann H, Ayinde D, Logue EC, Dragin L, et al. SAMHD1 restricts the replication of human immunodeficiency virus type 1 by depleting the intracellular pool of deoxynucleoside triphosphates. *Nat Immunol.* févr 2012;13(3):223-8.
- Lama J, Mangasarian A, Trono D. Cell-surface expression of CD4 reduces HIV-1 infectivity by blocking Env incorporation in a Nef- and Vpu-inhibitable manner. *Curr Biol.* 17 juin 1999;9(12):622-31.
- Lambotte O, Boufassa F, Madec Y, Nguyen A, Goujard C, Meyer L, et al. HIV Controllers: A Homogeneous Group of HIV-1--Infected Patients with Spontaneous Control of Viral Replication. *Clinical Infectious Diseases.* 1 oct 2005;41(7):1053-6.
- Lambotte O, Ferrari G, Moog C, Yates NL, Liao H-X, Parks RJ, et al. Heterogeneous neutralizing antibody and antibody-dependent cell cytotoxicity responses in HIV-1 elite controllers: *AIDS.* mai 2009;23(8):897-906.
- Landry S, Halin M, Lefort S, Audet B, Vaquero C, Mesnard J-M, et al. Detection, characterization and regulation of antisense transcripts in HIV-1. *Retrovirology.* 2007;4(1):71.
- Langford SE, Ananworanich J, Cooper DA. Predictors of disease progression in HIV infection: a review. *AIDS Research and Therapy.* 2007;4(1):11.
- Larder BA, Kemp SD, Harrigan PR. Potential mechanism for sustained antiretroviral efficacy of AZT-3TC combination therapy. *Science.* 4 août 1995;269(5224):696-9.
- Larocca D, Chao LA, Seto MH, Brunck TK. Human T-cell leukemia virus minus strand transcription in infected T-cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 15 sept 1989;163(2):1006-13.

- Larocque É, Halin M, Landry S, Marriott SJ, Switzer WM, Barbeau B. Human T-Cell Lymphotropic Virus Type 3 (HTLV-3)- and HTLV-4-Derived Antisense Transcripts Encode Proteins with Similar Tax-Inhibiting Functions but Distinct Subcellular Localization. *J Virol.* déc 2011;85(23):12673-85.
- Laverdure S, Gross A, Arpin-Andre C, Clerc I, Beaumelle B, Barbeau B, et al. HIV-1 Antisense Transcription Is Preferentially Activated in Primary Monocyte-Derived Cells. *Journal of Virology.* 15 déc 2012;86(24):13785-9.
- Le Tortorec A, Neil SJD. Antagonism to and intracellular sequestration of human tetherin by the human immunodeficiency virus type 2 envelope glycoprotein. *J Virol.* nov 2009;83(22):11966-78.
- Lee GQ, Lichterfeld M. Diversity of HIV-1 reservoirs in CD4+ T-cell subpopulations. *Curr Opin HIV AIDS.* 2016;11(4):383-7.
- Lemey P, Rambaut A, Pybus OG. HIV evolutionary dynamics within and among hosts. *AIDS Rev.* sept 2006;8(3):125-40.
- Lenasi T, Contreras X, Peterlin BM. Transcriptional Interference Antagonizes Proviral Gene Expression to Promote HIV Latency. *Cell Host Microbe.* 14 août 2008;4(2):123-33.
- Lenassi M, Cagney G, Liao M, Vaupotič T, Bartholomeeusen K, Cheng Y, et al. HIV Nef is secreted in exosomes and triggers apoptosis in bystander CD4+ T cells. *Traffic.* janv 2010;11(1):110-22.
- Leslie AJ, Pfafferott KJ, Chetty P, Draenert R, Addo MM, Feeney M, et al. HIV evolution: CTL escape mutation and reversion after transmission. *Nat Med.* mars 2004;10(3):282-9.
- van Leth F, Andrews S, Grinsztejn B, Wilkins E, Lazanas MK, Lange JMA, et al. The effect of baseline CD4 cell count and HIV-1 viral load on the efficacy and safety of nevirapine or efavirenz-based first-line HAART. *AIDS.* 25 mars 2005;19(5):463-71.
- Levy DN, Refaeli Y, MacGregor RR, Weiner DB. Serum Vpr regulates productive infection and latency of human immunodeficiency virus type 1. *Proc Natl Acad Sci USA.* 8 nov 1994;91(23):10873-7.
- Levy DN, Refaeli Y, Weiner DB. Extracellular Vpr protein increases cellular permissiveness to human immunodeficiency virus replication and reactivates virus from latency. *J Virol.* févr 1995;69(2):1243-52.
- Lewinski MK, Jafari M, Zhang H, Opella SJ, Guatelli J. Membrane Anchoring by a C-terminal Tryptophan Enables HIV-1 Vpu to Displace Bone Marrow Stromal Antigen 2 (BST2) from Sites of Viral Assembly. *J Biol Chem.* 24 avr 2015;290(17):10919-33.
- Lewinski MK, Yamashita M, Emerman M, Ciuffi A, Marshall H, Crawford G, et al. Retroviral DNA integration: viral and cellular determinants of target-site selection. *PLoS Pathog.* juin 2006;2(6):e60.
- Lewis MJ, Dagarag M, Khan B, Ali A, Yang OO. Partial escape of HIV-1 from cytotoxic T lymphocytes during chronic infection. *J Virol.* juill 2012;86(13):7459-63.
- Li M, Kao E, Gao X, Sandig H, Limmer K, Pavon-Eternod M, et al. Codon-usage-based inhibition of HIV protein synthesis by human schlafen 11. *Nature.* 1 nov 2012;491(7422):125-8.

- Lim ES, Fregoso OI, McCoy CO, Matsen FA, Malik HS, Emerman M. The ability of primate lentiviruses to degrade the monocyte restriction factor SAMHD1 preceded the birth of the viral accessory protein Vpx. *Cell Host Microbe*. 16 févr 2012;11(2):194-204.
- Ling Y, Jiang P, Li N, Yan Q, Wang X. A luciferase immunoprecipitation assay for the detection of proinsulin/insulin autoantibodies. *Clin Biochem*. avr 2018;54:51-5.
- Liu B, Zhao X, Shen W, Kong X. Evidence for the antisense transcription in the proviral R29-127 strain of bovine immunodeficiency virus. *Viol Sin*. juin 2015;30(3):224-7.
- Liu Z, Torresilla C, Xiao Y, Nguyen PT, Caté C, Barbosa K, et al. HIV-1 Antisense Protein of Different Clades Induces Autophagy and Associates with the Autophagy Factor p62. *J Virol*. 2019 Jan 4;93(2). pii: e01757-18.
- Liu Z, Xiao Y, Torresilla C, Rassart É, Barbeau B. Implication of Different HIV-1 Genes in the Modulation of Autophagy. *Viruses*. 2017 Dec 18;9(12). pii: E389.
- Livengood JA, Nyborg JK. The high-affinity Sp1 binding site in the HTLV-1 promoter contributes to Tax-independent basal expression. *Nucleic Acids Res*. 2004;32(9):2829-37.
- van der Loeff MFS, Larke N, Kaye S, Berry N, Ariyoshi K, Alabi A, et al. Undetectable plasma viral load predicts normal survival in HIV-2-infected people in a West African village. *Retrovirology*. 19 mai 2010;7:46.
- Lu J, Pan Q, Rong L, He W, Liu S-L, Liang C. The IFITM proteins inhibit HIV-1 infection. *J Virol*. mars 2011;85(5):2126-37.
- Luciw PA, Cheng-Mayer C, Levy JA. Mutational analysis of the human immunodeficiency virus: the orf-B region down-regulates virus replication. *Proc Natl Acad Sci USA*. mars 1987;84(5):1434-8.
- Lund JM, Broliden K, Pyra MN, Thomas KK, Donnell D, Irungu E, et al. Correction for Lund et al., HIV-1-Neutralizing IgA Detected in Genital Secretions of Highly HIV-1-Exposed Seronegative Women on Oral Preexposure Prophylaxis. *J Virol*. 2017 Jan 18;91(3). pii: e02074-16.
- Mabuka J, Nduati R, Odem-Davis K, Peterson D, Overbaugh J. HIV-specific antibodies capable of ADCC are common in breastmilk and are associated with reduced risk of transmission in women with high viral loads. *PLoS Pathog*. 2012;8(6):e1002739.
- MacGlashan DW. IgE-dependent signaling as a therapeutic target for allergies. *Trends Pharmacol Sci*. sept 2012;33(9):502-9.
- Makvandi-Nejad S, Rowland-Jones S. How does the humoral response to HIV-2 infection differ from HIV-1 and can this explain the distinct natural history of infection with these two human retroviruses? *Immunol Lett*. janv 2015;163(1):69-75.
- Maldarelli F, Wu X, Su L, Simonetti FR, Shao W, Hill S, et al. HIV latency. Specific HIV integration sites are linked to clonal expansion and persistence of infected cells. *Science*. 11 juill 2014;345(6193):179-83.
- Malek A, Sager R, Schneider H. Maternal-fetal transport of immunoglobulin G and its subclasses during the third trimester of human pregnancy. *Am J Reprod Immunol*. août 1994;32(1):8-14.

- Malim MH, Hauber J, Le SY, Maizel JV, Cullen BR. The HIV-1 rev trans-activator acts through a structured target sequence to activate nuclear export of unspliced viral mRNA. *Nature*. 16 mars 1989;338(6212):254-7.
- Mancarella A, Procopio FA, Achsel T, De Crignis E, Foley BT, Corradin G, et al. Detection of antisense protein (ASP) RNA transcripts in individuals infected with human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1). *J Gen Virol*. mai 2019;100(5):863-76.
- Maness NJ, Valentine LE, May GE, Reed J, Piaskowski SM, Soma T, et al. AIDS virus-specific CD8+ T lymphocytes against an immunodominant cryptic epitope select for viral escape. *J Exp Med*. 29 oct 2007;204(11):2505-12.
- Mangeat B, Gers-Huber G, Lehmann M, Zufferey M, Luban J, Piguet V. HIV-1 Vpu neutralizes the antiviral factor Tetherin/BST-2 by binding it and directing its beta-TrCP2-dependent degradation. *PLoS Pathog*. sept 2009;5(9):e1000574.
- Mangeat B, Turelli P, Caron G, Friedli M, Perrin L, Trono D. Broad antiretroviral defence by human APOBEC3G through lethal editing of nascent reverse transcripts. *Nature*. 3 juill 2003;424(6944):99-103.
- Mangeot P-E, Duperrier K, Nègre D, Boson B, Rigal D, Cosset F-L, et al. High levels of transduction of human dendritic cells with optimized SIV vectors. *Mol Ther*. mars 2002;5(3):283-90.
- Marchetti G, Cozzi-Lepri A, Merlini E, Bellistri GM, Castagna A, Galli M, et al. Microbial translocation predicts disease progression of HIV-infected antiretroviral-naïve patients with high CD4+ cell count. *AIDS*. 17 juill 2011;25(11):1385-94.
- Marin M, Rose KM, Kozak SL, Kabat D. HIV-1 Vif protein binds the editing enzyme APOBEC3G and induces its degradation. *Nat Med*. nov 2003;9(11):1398-403.
- Martin GE, Pace M, Thornhill JP, Phetsouphanh C, Meyerowitz J, Gossez M, et al. CD32-Expressing CD4 T Cells Are Phenotypically Diverse and Can Contain Proviral HIV DNA. *Front Immunol*. 2018 May 4;9:928.
- Martinez V, Costagliola D, Bonduelle O, N'Go N, Schnuriger A, Théodorou I, et al. Combination of HIV-1-Specific CD4 Th1 Cell Responses and IgG2 Antibodies Is the Best Predictor for Persistence of Long-Term Nonprogression. *The Journal of Infectious Diseases*. 15 juin 2005;191(12):2053-63.
- Matías J, Berzosa M, Pastor Y, Irache JM, Gamazo C. Maternal Vaccination. Immunization of Sows during Pregnancy against ETEC Infections. *Vaccines*. déc 2017;5(4):48.
- Mayer BJ. SH3 domains: complexity in moderation. *J Cell Sci*. avr 2001;114(Pt 7):1253-63.
- Mayrand SM, Schwarz DA, Green WR. An alternative translational reading frame encodes an immunodominant retroviral CTL determinant expressed by an immunodeficiency-causing retrovirus. *J Immunol*. 1 janv 1998;160(1):39-50.
- McMichael AJ, Borrow P, Tomaras GD, Goonetilleke N, Haynes BF. The immune response during acute HIV-1 infection: clues for vaccine development. *Nat Rev Immunol*. janv 2010;10(1):11-23.
- McNatt MW, Zang T, Bieniasz PD. Vpu binds directly to tetherin and displaces it from nascent virions. *PLoS Pathog*. 2013;9(4):e1003299.

- Mehandru S, Vcelar B, Wrin T, Stiegler G, Joos B, Mohri H, et al. Adjunctive passive immunotherapy in human immunodeficiency virus type 1-infected individuals treated with antiviral therapy during acute and early infection. *J Virol.* oct 2007;81(20):11016-31.
- Melkamu H, Seyoum B, Dessie Y. Determinants of Tuberculosis Infection among Adult HIV Positives Attending Clinical Care in Western Ethiopia: A Case-Control Study. *AIDS Res Treat.* 2013;2013:279876.
- Mesin L, Ersching J, Victora GD. Germinal Center B Cell Dynamics. *Immunity.* 20 2016;45(3):471-82.
- Michael NL, Vahey MT, d'Arcy L, Ehrenberg PK, Mosca JD, Rappaport J, et al. Negative-strand RNA transcripts are produced in human immunodeficiency virus type 1-infected cells and patients by a novel promoter downregulated by Tat. *J Virol.* févr 1994;68(2):979-87.
- Michel N, Allespach I, Venzke S, Fackler OT, Keppler OT. The Nef protein of human immunodeficiency virus establishes superinfection immunity by a dual strategy to downregulate cell-surface CCR5 and CD4. *Curr Biol.* 26 avr 2005;15(8):714-23.
- Miller CM, Akiyama H, Agosto LM, Emery A, Ettinger CR, Swanstrom RI, et al. Virion-Associated Vpr Alleviates a Postintegration Block to HIV-1 Infection of Dendritic Cells. *J Virol.* 01 2017;91(13).
- Miller RH. Human immunodeficiency virus may encode a novel protein on the genomic DNA plus strand. *Science.* 18 mars 1988;239(4846):1420-2.
- Miura M, Yasunaga J, Tanabe J, Sugata K, Zhao T, Ma G, et al. Characterization of simian T-cell leukemia virus type 1 in naturally infected Japanese macaques as a model of HTLV-1 infection. *Retrovirology.* 24 oct 2013;10:118.
- Miyakawa K, Ryo A, Murakami T, Ohba K, Yamaoka S, Fukuda M, et al. BCA2/Rabring7 promotes tetherin-dependent HIV-1 restriction. *PLoS Pathog.* déc 2009;5(12):e1000700.
- Mkaddem SB, Christou I, Rossato E, Berthelot L, Lehuen A, Monteiro RC. IgA, IgA receptors, and their anti-inflammatory properties. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2014;382:221-35.
- Molé CM, Montagne PM, Béné MC, Faure GC. Sequential assay of human milk immunoglobulins shows a predominance of lambda chains. *Lab Invest.* juill 1992;67(1):147-51.
- Montano MA, Novitsky VA, Blackard JT, Cho NL, Katzenstein DA, Essex M. Divergent transcriptional regulation among expanding human immunodeficiency virus type 1 subtypes. *J Virol.* nov 1997;71(11):8657-65.
- Moog C, Fleury HJ, Pellegrin I, Kirn A, Aubertin AM. Autologous and heterologous neutralizing antibody responses following initial seroconversion in human immunodeficiency virus type 1-infected individuals. *J Virol.* mai 1997;71(5):3734-41.
- Moris A, Murray S, Cardinaud S. AID and APOBECs span the gap between innate and adaptive immunity. *Front Microbiol.* 2014;5:534.
- Moris A, Nobile C, Buseyne F, Porrot F, Abastado J-P, Schwartz O. DC-SIGN promotes exogenous MHC-I-restricted HIV-1 antigen presentation. *Blood.* 1 avr 2004;103(7):2648-54.

- Moris A, Pajot A, Blanchet F, Guivel-Benhassine F, Salcedo M, Schwartz O. Dendritic cells and HIV-specific CD4+ T cells: HIV antigen presentation, T-cell activation, and viral transfer. *Blood*. 1 sept 2006;108(5):1643-51.
- Mourez T, Simon F, Plantier J-C. Non-M variants of human immunodeficiency virus type 1. *Clin Microbiol Rev*. juill 2013;26(3):448-61.
- Murakami T, Freed EO. Genetic evidence for an interaction between human immunodeficiency virus type 1 matrix and alpha-helix 2 of the gp41 cytoplasmic tail. *J Virol*. avr 2000;74(8):3548-54.
- Musacchio A. How SH3 domains recognize proline. *Adv Protein Chem*. 2002;61:211-68.
- Mussini C, Lorenzini P, Cozzi-Lepri A, Lapadula G, Marchetti G, Nicastrì E, et al. CD4/CD8 ratio normalisation and non-AIDS-related events in individuals with HIV who achieve viral load suppression with antiretroviral therapy: an observational cohort study. *Lancet HIV*. mars 2015;2(3):e98-106.
- Nadembega WM, Giannella S, Simpore J, Ceccherini-Silberstein F, Pietra V, Bertoli A, et al. Characterization of drug-resistance mutations in HIV-1 isolates from non-HAART and HAART treated patients in Burkina Faso. *J Med Virol*. nov 2006;78(11):1385-91.
- Naghavi MH, Estable MC, Schwartz S, Roeder RG, Vahlne A. Upstream stimulating factor affects human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) long terminal repeat-directed transcription in a cell-specific manner, independently of the HIV-1 subtype and the core-negative regulatory element. *Journal of General Virology*. 2001;82(3):547-59.
- Nagot N, Kankasa C, Tumwine JK, Meda N, Hofmeyr GJ, Vallo R, et al. Extended pre-exposure prophylaxis with lopinavir-ritonavir versus lamivudine to prevent HIV-1 transmission through breastfeeding up to 50 weeks in infants in Africa (ANRS 12174): a randomised controlled trial. *The Lancet*. 6 févr 2016;387(10018):566-73.
- Neil SJD, Zang T, Bieniasz PD. Tetherin inhibits retrovirus release and is antagonized by HIV-1 Vpu. *Nature*. 24 janv 2008;451(7177):425-30.
- Ngo-Giang-Huong N, Candotti D, Goubar A, Autran B, Maynard M, Sicard D, et al. HIV Type 1-Specific IgG2 Antibodies: Markers of Helper T Cell Type 1 Response and Prognostic Marker of Long-Term Nonprogression. *AIDS Research and Human Retroviruses*. 10 oct 2001;17(15):1435-46.
- Ngo-Giang-Huong N, Huynh THK, Dagnra AY, Toni T, Maiga AI, Kania D, et al. Prevalence of pretreatment HIV drug resistance in West African and Southeast Asian countries. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 1 févr 2019;74(2):462-7.
- Ngoupo PA, Sadeuh-Mba SA, De Oliveira F, Ngono V, Ngono L, Tchendjou P, et al. First evidence of transmission of an HIV-1 M/O intergroup recombinant virus. *AIDS*. 2 janv 2016;30(1):1-8.
- Nicoli F, Chachage M, Clowes P, Bauer A, Kowour D, Ensoli B, et al. Association between different anti-Tat antibody isotypes and HIV disease progression: data from an African cohort. *BMC Infect Dis*. 2016 Jul 22;16:344.
- Nigam P, Velu V, Kannanganat S, Chennareddi L, Kwa S, Siddiqui M, et al. Expansion of FOXP3+ CD8 T cells with suppressive potential in colorectal mucosa following a pathogenic simian immunodeficiency virus infection correlates with diminished antiviral T cell response and viral control. *J Immunol*. 15 févr 2010;184(4):1690-701.

- Niwa H, Yamamura K, Miyazaki J. Efficient selection for high-expression transfectants with a novel eukaryotic vector. *Gene*. 15 déc 1991;108(2):193-9.
- Nouhin J, Ngin S, Martin PR, Marcy O, Kruey L, Ariey F, et al. Low prevalence of drug resistance transmitted virus in HIV Type 1-infected ARV-naive patients in Cambodia. *AIDS Res Hum Retroviruses*. mai 2009;25(5):543-5.
- Ogawa Y, Sun BK, Lee JT. Intersection of the RNA interference and X-inactivation pathways. *Science*. 6 juin 2008;320(5881):1336-41.
- Ohagen A, Gabuzda D. Role of Vif in stability of the human immunodeficiency virus type 1 core. *J Virol*. déc 2000;74(23):11055-66.
- O'Neil C, Lee D, Clewley G, Johnson MA, Emery VC. Prevalence of anti-vif antibodies in HIV-1 infected individuals assessed using recombinant baculovirus expressed vif protein. *J Med Virol*. mars 1997;51(3):139-44.
- van Opijnen T, Jeeninga RE, Boerlijst MC, Pollakis GP, Zetterberg V, Salminen M, et al. Human immunodeficiency virus type 1 subtypes have a distinct long terminal repeat that determines the replication rate in a host-cell-specific manner. *J Virol*. avr 2004;78(7):3675-83.
- Ostrowski MA, Chun TW, Justement SJ, Motola I, Spinelli MA, Adelsberger J, et al. Both memory and CD45RA+/CD62L+ naive CD4(+) T cells are infected in human immunodeficiency virus type 1-infected individuals. *J Virol*. août 1999;73(8):6430-5.
- Oxenius A, Price DA, Hersberger M, Schlaepfer E, Weber R, Weber M, et al. HIV-specific cellular immune response is inversely correlated with disease progression as defined by decline of CD4+ T cells in relation to HIV RNA load. *J Infect Dis*. 1 avr 2004;189(7):1199-208.
- 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*. 11 mars 2008;105(10):3879-84.
- Pantaleo G, Graziosi C, Demarest JF, Butini L, Montroni M, Fox CH, et al. HIV infection is active and progressive in lymphoid tissue during the clinically latent stage of disease. *Nature*. 25 mars 1993;362(6418):355-8.
- Pasternak AO, Berkhout B. What do we measure when we measure cell-associated HIV RNA. *Retrovirology*. 29 2018;15(1):13.
- Patel P, Borkowf CB, Brooks JT, Lasry A, Lansky A, Mermin J. Estimating per-act HIV transmission risk: a systematic review. *AIDS*. 19 juin 2014;28(10):1509-19.
- Pavesi A, Vianelli A, Chirico N, Bao Y, Blinkova O, Belshaw R, et al. Overlapping genes and the proteins they encode differ significantly in their sequence composition from non-overlapping genes. *PLoS ONE*. 2018;13(10):e0202513.
- Paxton W, Connor RI, Landau NR. Incorporation of Vpr into human immunodeficiency virus type 1 virions: requirement for the p6 region of gag and mutational analysis. *J Virol*. déc 1993;67(12):7229-37.
- Peeters A, Lambert PF, Deacon NJ. A fourth Sp1 site in the human immunodeficiency virus type 1 long terminal repeat is essential for negative-sense transcription. *J Virol*. oct 1996;70(10):6665-72.

- Peeters M, Liegeois F, Torimiro N, Bourgeois A, Mpoudi E, Vergne L, et al. Characterization of a highly replicative intergroup M/O human immunodeficiency virus type 1 recombinant isolated from a Cameroonian patient. *J Virol.* sept 1999;73(9):7368-75.
- Peng BJ, Carlson JM, Liu MKP, Gao F, Goonetilleke N, McMichael AJ, et al. Antisense-Derived HIV-1 Cryptic Epitopes Are Not Major Drivers of Viral Evolution during the Acute Phase of Infection. *J Virol.* 01 2018;92(19).
- Perelson AS, Essunger P, Cao Y, Vesanen M, Hurley A, Saksela K, et al. Decay characteristics of HIV-1-infected compartments during combination therapy. *Nature.* 8 mai 1997;387(6629):188-91.
- Pereyra F, Addo MM, Kaufmann DE, Liu Y, Miura T, Rathod A, et al. Genetic and Immunologic Heterogeneity among Persons Who Control HIV Infection in the Absence of Therapy. *The Journal of Infectious Diseases.* 15 févr 2008;197(4):563-71.
- Perez-Caballero D, Zang T, Ebrahimi A, McNatt MW, Gregory DA, Johnson MC, et al. Tetherin inhibits HIV-1 release by directly tethering virions to cells. *Cell.* 30 oct 2009;139(3):499-511.
- Permar SR, Fong Y, Vandergrift N, Fouda GG, Gilbert P, Parks R, et al. Maternal HIV-1 envelope-specific antibody responses and reduced risk of perinatal transmission. *J Clin Invest.* 1 juill 2015;125(7):2702-6.
- Phillips AN, Lundgren JD. The CD4 lymphocyte count and risk of clinical progression. *Curr Opin HIV AIDS.* janv 2006;1(1):43-9.
- Piller SC, Ewart GD, Premkumar A, Cox GB, Gage PW. Vpr protein of human immunodeficiency virus type 1 forms cation-selective channels in planar lipid bilayers. *Proc Natl Acad Sci USA.* 9 janv 1996;93(1):111-5.
- Plantier J-C, Leoz M, Dickerson JE, De Oliveira F, Cordonnier F, Lemée V, et al. A new human immunodeficiency virus derived from gorillas. *Nat Med.* août 2009;15(8):871-2.
- Poiesz BJ, Ruscetti FW, Gazdar AF, Bunn PA, Minna JD, Gallo RC. Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci USA.* déc 1980;77(12):7415-9.
- Poles MA, Boscardin WJ, Elliott J, Taing P, Fuerst MMP, McGowan I, et al. Lack of decay of HIV-1 in gut-associated lymphoid tissue reservoirs in maximally suppressed individuals. *J Acquir Immune Defic Syndr.* sept 2006;43(1):65-8.
- Pollack RA, Jones RB, Perteau M, Bruner KM, Martin AR, Thomas AS, et al. Defective HIV-1 proviruses are expressed and can be recognized by cytotoxic T lymphocytes which shapes the proviral landscape. *Cell Host Microbe.* 12 avr 2017;21(4):494-506.e4.
- Pollara J, McGuire E, Fouda GG, Rountree W, Eudailey J, Overman RG, et al. Association of HIV-1 Envelope-Specific Breast Milk IgA Responses with Reduced Risk of Postnatal Mother-to-Child Transmission of HIV-1. *Silvestri G, éditeur. Journal of Virology.* 1 oct 2015;89(19):9952-61.
- Posch W, Cardinaud S, Hamimi C, Fletcher A, Mühlbacher A, Loacker K, et al. Antibodies attenuate the capacity of dendritic cells to stimulate HIV-specific cytotoxic T lymphocytes. *J Allergy Clin Immunol.* déc 2012;130(6):1368-74.e2.

- Puigdomènech I, Casartelli N, Porrot F, Schwartz O. SAMHD1 restricts HIV-1 cell-to-cell transmission and limits immune detection in monocyte-derived dendritic cells. *J Virol.* mars 2013;87(5):2846-56.
- Raffi F, Babiker AG, Richert L, Molina J-M, George EC, Antinori A, et al. Ritonavir-boosted darunavir combined with raltegravir or tenofovir-emtricitabine in antiretroviral-naïve adults infected with HIV-1: 96 week results from the NEAT001/ANRS143 randomised non-inferiority trial. *Lancet.* 29 nov 2014;384(9958):1942-51.
- Rasmussen MH, Ballarín-González B, Liu J, Lassen LB, Füchtbauer A, Füchtbauer E-M, et al. Antisense transcription in gammaretroviruses as a mechanism of insertional activation of host genes. *J Virol.* avr 2010;84(8):3780-8.
- Ratner L, Starcich B, Josephs SF, Hahn BH, Reddy EP, Livak KJ, et al. Polymorphism of the 3' open reading frame of the virus associated with the acquired immune deficiency syndrome, human T-lymphotropic virus type III. *Nucleic Acids Res.* 25 nov 1985;13(22):8219-29.
- Ravetch JV, Bolland S. IgG Fc Receptors. *Annual Review of Immunology.* 2001;19(1):275-90.
- Regoes RR, Bonhoeffer S. The HIV coreceptor switch: a population dynamical perspective. *Trends Microbiol.* juin 2005;13(6):269-77.
- Reiss P, Lange JMA, de Ronde A, de Wolf F, Dekker J, Debuick C, et al. Speed of progression to AIDS and degree of antibody response to accessory gene products of HIV-1. *Journal of Medical Virology.* mars 1990;30(3):163-8.
- Rekosh D, Hammarskjöld M-L. Intron Retention in Viruses and Cellular Genes: Detention, Border Controls and Passports. *Wiley Interdiscip Rev RNA.* mai 2018;9(3):e1470.
- Renjifo B, Fawzi W, Mwakagile D, Hunter D, Msamanga G, Spiegelman D, et al. Differences in perinatal transmission among human immunodeficiency virus type 1 genotypes. *J Hum Virol.* févr 2001;4(1):16-25.
- Rerks-Ngarm S, Pitisuttithum P, Nitayaphan S, Kaewkungwal J, Chiu J, Paris R, et al. Vaccination with ALVAC and AIDSVAX to Prevent HIV-1 Infection in Thailand. *New England Journal of Medicine.* 3 déc 2009;361(23):2209-20.
- Rezza G, Fiorelli V, Dorrucchi M, Ciccozzi M, Tripiciano A, Scoglio A, et al. The Presence of Anti-Tat Antibodies Is Predictive of Long-Term Nonprogression to AIDS or Severe Immunodeficiency: Findings in a Cohort of HIV-1 Seroconverters. *The Journal of Infectious Diseases.* 15 avr 2005;191(8):1321-4.
- Richardson MW, Mirchandani J, Duong J, Grimaldo S, Kocieda V, Hendel H, et al. Antibodies to Tat and Vpr in the GRIV cohort: differential association with maintenance of long-term non-progression status in HIV-1 infection. *Biomedicine & Pharmacotherapy.* janv 2003;57(1):4-14.
- Rinn JL, Kertesz M, Wang JK, Squazzo SL, Xu X, Bruggmann SA, et al. Functional demarcation of active and silent chromatin domains in human HOX loci by noncoding RNAs. *Cell.* 29 juin 2007;129(7):1311-23.
- Roques P, Robertson DL, Souquière S, Damond F, Ayoub A, Farfara I, et al. Phylogenetic analysis of 49 newly derived HIV-1 group O strains: high viral diversity but no group M-like subtype structure. *Virology.* 25 oct 2002;302(2):259-73.

- Rosa A, Chande A, Ziglio S, De Sanctis V, Bertorelli R, Goh SL, et al. HIV-1 Nef promotes infection by excluding SERINC5 from virion incorporation. *Nature*. 8 oct 2015;526(7572):212-7.
- Roshal M, Kim B, Zhu Y, Nghiem P, Planelles V. Activation of the ATR-mediated DNA damage response by the HIV-1 viral protein R. *J Biol Chem*. 11 juill 2003;278(28):25879-86.
- Rouet F, Ménan H, Viljoen J, Ngo-Giang-Huong N, Mandaliya K, Valéa D, et al. In-house HIV-1 RNA real-time RT-PCR assays: principle, available tests and usefulness in developing countries. *Expert Rev Mol Diagn*. sept 2008;8(5):635-50.
- Ruelle J, Yfantis V, Duquenne A, Goubau P. Validation of an ultrasensitive digital droplet PCR assay for HIV-2 plasma RNA quantification. *J Int AIDS Soc*. 2014;17(4 Suppl 3):19675.
- Ruiz A, Blanch-Lombarte O, Jimenez-Moyano E, Ouchi D, Mothe B, Peña R, et al. Antigen Production After Latency Reversal and Expression of Inhibitory Receptors in CD8+ T Cells Limit the Killing of HIV-1 Reactivated Cells. *Front Immunol*. 2019 Jan 22;9:3162.
- Ryoo J, Choi J, Oh C, Kim S, Seo M, Kim S-Y, et al. The ribonuclease activity of SAMHD1 is required for HIV-1 restriction. *Nat Med*. août 2014;20(8):936-41.
- Saag MS, Benson CA, Gandhi RT, Hoy JF, Landovitz RJ, Mugavero MJ, et al. Antiretroviral Drugs for Treatment and Prevention of HIV Infection in Adults: 2018 Recommendations of the International Antiviral Society–USA Panel. *JAMA*. 24 juill 2018;320(4):379.
- Saayman S, Ackley A, Turner A-MW, Famiglietti M, Bosque A, Clemson M, et al. An HIV-Encoded Antisense Long Noncoding RNA Epigenetically Regulates Viral Transcription. *Molecular Therapy*. juin 2014;22(6):1164-75.
- Sabath N, Wagner A, Karlin D. Evolution of Viral Proteins Originated De Novo by Overprinting. *Mol Biol Evol*. déc 2012;29(12):3767-80.
- Sadowski I, Hashemi FB. Strategies to eradicate HIV from infected patients: elimination of latent provirus reservoirs. *Cell Mol Life Sci*. 25 mai 2019; 76(18):3583-3600.
- Sáez-Cirión A, Lacabaratz C, Lambotte O, Versmisse P, Urrutia A, Boufassa F, et al. HIV controllers exhibit potent CD8 T cell capacity to suppress HIV infection ex vivo and peculiar cytotoxic T lymphocyte activation phenotype. *Proc Natl Acad Sci USA*. 17 avr 2007a;104(16):6776-81.
- Sáez-Cirión A, Pancino G, Sinet M, Venet A, Lambotte O, ANRS EP36 HIV CONTROLLERS study group. HIV controllers: how do they tame the virus? *Trends Immunol*. déc 2007b;28(12):532-40.
- Sagna T, Bisseye C, Compaore TR, Kagone TS, Djigma FW, Ouermi D, et al. Prevention of mother-to-child HIV-1 transmission in Burkina Faso: evaluation of vertical transmission by PCR, molecular characterization of subtypes and determination of antiretroviral drugs resistance. *Glob Health Action*. 27 janv 2015;8:26065.
- Said EA, Dupuy FP, Trautmann L, Zhang Y, Shi Y, El-Far M, et al. Programmed death-1-induced interleukin-10 production by monocytes impairs CD4+ T cell activation during HIV infection. *Nat Med*. avr 2010;16(4):452-9.
- Sajadi MM, Farshidpour M, Brown EP, Ouyang X, Seaman MS, Pazgier M, et al. λ Light Chain Bias Associated With Enhanced Binding and Function of Anti-HIV Env Glycoprotein Antibodies. *J Infect Dis*. 1 janv 2016;213(1):156-64.

- Salemi M, Strimmer K, Hall WW, Duffy M, Delaporte E, Mboup S, et al. Dating the common ancestor of SIVcpz and HIV-1 group M and the origin of HIV-1 subtypes using a new method to uncover clock-like molecular evolution. *FASEB J.* févr 2001;15(2):276-8.
- Satou Y, Yasunaga J, Yoshida M, Matsuoka M. HTLV-I basic leucine zipper factor gene mRNA supports proliferation of adult T cell leukemia cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 17 janv 2006;103(3):720-5.
- Satou Y, Yasunaga J-I, Zhao T, Yoshida M, Miyazato P, Takai K, et al. HTLV-1 bZIP factor induces T-cell lymphoma and systemic inflammation in vivo. *PLoS Pathog.* 10 févr 2011;7(2):e1001274.
- Sauter D, Hotter D, Van Driessche B, Stürzel CM, Kluge SF, Wildum S, et al. Differential regulation of NF- κ B-mediated proviral and antiviral host gene expression by primate lentiviral Nef and Vpu proteins. *Cell Rep.* 3 févr 2015;10(4):586-99.
- Sauter D, Schindler M, Specht A, Landford WN, Münch J, Kim K-A, et al. Tetherin-driven adaptation of Vpu and Nef function and the evolution of pandemic and nonpandemic HIV-1 strains. *Cell Host Microbe.* 19 nov 2009;6(5):409-21.
- Schaller T, Ocwieja KE, Rasaiyaah J, Price AJ, Brady TL, Roth SL, et al. HIV-1 capsid-cyclophilin interactions determine nuclear import pathway, integration targeting and replication efficiency. *PLoS Pathog.* déc 2011;7(12):e1002439.
- Scharf O, Golding H, King LR, Eller N, Frazier D, Golding B, et al. Immunoglobulin G3 from Polyclonal Human Immunodeficiency Virus (HIV) Immune Globulin Is More Potent than Other Subclasses in Neutralizing HIV Type 1. *Journal of Virology.* 15 juill 2001;75(14):6558-65.
- Schatz M, Tong PBV, Beaumelle B. Unconventional secretion of viral proteins. *Seminars in Cell & Developmental Biology.* 1 nov 2018;83:8-11.
- Schröder ARW, Shinn P, Chen H, Berry C, Ecker JR, Bushman F. HIV-1 Integration in the Human Genome Favors Active Genes and Local Hotspots. *Cell.* 23 août 2002;110(4):521-9.
- Schroeder HW, Cavacini L. Structure and function of immunoglobulins. *Journal of Allergy and Clinical Immunology.* févr 2010;125(2):S41-52.
- Schwartz O, Maréchal V, Le Gall S, Lemonnier F, Heard JM. Endocytosis of major histocompatibility complex class I molecules is induced by the HIV-1 Nef protein. *Nat Med.* mars 1996;2(3):338-42.
- Sengupta S, Siliciano RF. Targeting the Latent Reservoir for HIV-1. *Immunity.* 15 2018;48(5):872-95.
- Serrano-Villar S, Sainz T, Lee SA, Hunt PW, Sinclair E, Shacklett BL, et al. HIV-infected individuals with low CD4/CD8 ratio despite effective antiretroviral therapy exhibit altered T cell subsets, heightened CD8+ T cell activation, and increased risk of non-AIDS morbidity and mortality. *PLoS Pathog.* mai 2014;10(5):e1004078.
- Sette P, Nagashima K, Piper RC, Bouamr F. Ubiquitin conjugation to Gag is essential for ESCRT-mediated HIV-1 budding. *Retrovirology.* 29 juill 2013;10:79.
- Shah AH, Sowrirajan B, Davis ZB, Ward JP, Campbell EM, Planelles V, et al. Degranulation of Natural Killer Cells Following Interaction with HIV-1-Infected Cells Is Hindered by Downmodulation of NTB-A by Vpu. *Cell Host Microbe.* 18 nov 2010;8(5):397-409.

- Shan L, Deng K, Shroff NS, Durand CM, Rabi SA, Yang H-C, et al. Stimulation of HIV-1-specific cytolytic T lymphocytes facilitates elimination of latent viral reservoir after virus reactivation. *Immunity*. 23 mars 2012;36(3):491-501.
- Shearwin KE, Callen BP, Egan JB. Transcriptional interference – a crash course. *Trends Genet*. juin 2005;21(6):339-45.
- Sheehy AM, Gaddis NC, Choi JD, Malim MH. Isolation of a human gene that inhibits HIV-1 infection and is suppressed by the viral Vif protein. *Nature*. 8 août 2002;418(6898):646-50.
- Sheehy AM, Gaddis NC, Malim MH. The antiretroviral enzyme APOBEC3G is degraded by the proteasome in response to HIV-1 Vif. *Nat Med*. nov 2003;9(11):1404-7.
- Shi J, Xiong R, Zhou T, Su P, Zhang X, Qiu X, et al. HIV-1 Nef Antagonizes SERINC5 Restriction by Downregulation of SERINC5 via the Endosome/Lysosome System. *J Virol*. 01 2018;92(11).
- Shiohama Y, Naito T, Matsuzaki T, Tanaka R, Tomoyose T, Takashima H, et al. Absolute quantification of HTLV-1 basic leucine zipper factor (HBZ) protein and its plasma antibody in HTLV-1 infected individuals with different clinical status. *Retrovirology*. 2016 Apr 27;13:29.
- Silby MW, Levy SB. Overlapping Protein-Encoding Genes in *Pseudomonas fluorescens* Pf0-1. *PLoS Genet*. 2008 Jun 13;4(6):e1000094.
- Simonetti FR, Sobolewski MD, Fyne E, Shao W, Spindler J, Hattori J, et al. Clonally expanded CD4+ T cells can produce infectious HIV-1 in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 16 févr 2016;113(7):1883-8.
- Sodroski J, Patarca R, Rosen C, Wong-Staal F, Haseltine W. Location of the trans-activating region on the genome of human T-cell lymphotropic virus type III. *Science*. 5 juill 1985;229(4708):74-7.
- Sol-Foulon N, Moris A, Nobile C, Boccaccio C, Engering A, Abastado J-P, et al. HIV-1 Nef-induced upregulation of DC-SIGN in dendritic cells promotes lymphocyte clustering and viral spread. *Immunity*. janv 2002;16(1):145-55.
- Soma-Pillay P, Catherine N-P, Tolppanen H, Mebazaa A, Tolppanen H, Mebazaa A. Physiological changes in pregnancy. *Cardiovasc J Afr*. 2016;27(2):89-94.
- Sowd GA, Serrao E, Wang H, Wang W, Fadel HJ, Poeschla EM, et al. A critical role for alternative polyadenylation factor CPSF6 in targeting HIV-1 integration to transcriptionally active chromatin. *PNAS*. 23 févr 2016;113(8):E1054-63.
- Staszewski S, Loveday C, Picazo JJ, Dellarmonica P, Skinhøj P, Johnson MA, et al. Safety and efficacy of lamivudine-zidovudine combination therapy in zidovudine-experienced patients. A randomized controlled comparison with zidovudine monotherapy. Lamivudine European HIV Working Group. *JAMA*. 10 juill 1996;276(2):111-7.
- Steffen BT, Steffen LM, Tracy R, Siscovick D, Jacobs D, Liu K, et al. Ethnicity, plasma phospholipid fatty acid composition and inflammatory/endothelial activation biomarkers in the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis (MESA). *European Journal of Clinical Nutrition*. mai 2012;66(5):600-5.
- Steinman RM. DC-SIGN: A Guide to Some Mysteries of Dendritic Cells. *Cell*. 3 mars 2000;100(5):491-4.

- Stekler JD, Tapia K, Maenza J, Stevens CE, Ure GA, O'Neal JD, et al. No Time to Delay! Fiebig Stages and Referral in Acute HIV infection: Seattle Primary Infection Program Experience. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 1 août 2018;34(8):657-66.
- Stiegler G, Armbruster C, Vcelar B, Stoiber H, Kunert R, Michael NL, et al. Antiviral activity of the neutralizing antibodies 2F5 and 2G12 in asymptomatic HIV-1-infected humans: a phase I evaluation. *AIDS*. 18 oct 2002;16(15):2019-25.
- Strebel K, Klimkait T, Martin M. A novel gene of HIV-1, vpu, and its 16-kilodalton product. *Science*. 2 sept 1988;241(4870):1221-3.
- Stremmlau M, Owens CM, Perron MJ, Kiessling M, Autissier P, Sodroski J. The cytoplasmic body component TRIM5 α restricts HIV-1 infection in Old World monkeys. *Nature*. 26 févr 2004;427(6977):848-53.
- Stumptner-Cuvelette P, Morchoisne S, Dugast M, Gall SL, Raposo G, Schwartz O, et al. HIV-1 Nef impairs MHC class II antigen presentation and surface expression. *PNAS*. 9 oct 2001;98(21):12144-9.
- Tada T, Zhang Y, Koyama T, Tobiume M, Tsunetsugu-Yokota Y, Yamaoka S, et al. MARCH8 inhibits HIV-1 infection by reducing virion incorporation of envelope glycoproteins. *Nat Med*. déc 2015;21(12):1502-7.
- Takehisa J, Kraus MH, Ayoub A, Bailes E, Van Heuverswyn F, Decker JM, et al. Origin and biology of simian immunodeficiency virus in wild-living western gorillas. *J Virol*. févr 2009;83(4):1635-48.
- Takehisa J, Zekeng L, Ido E, Yamaguchi-Kabata Y, Mboudjeka I, Harada Y, et al. Human immunodeficiency virus type 1 intergroup (M/O) recombination in cameroon. *J Virol*. août 1999;73(8):6810-20.
- Taylor RG, Walker DC, McInnes RR. E. coli host strains significantly affect the quality of small scale plasmid DNA preparations used for sequencing. *Nucleic Acids Res*. 11 avr 1993;21(7):1677-8.
- Terrasse R, Memmi M, Palle S, Heyndrickx L, Vanham G, Pozzetto B, et al. Visualization of X4- and R5-Tropic HIV-1 Viruses Expressing Fluorescent Proteins in Human Endometrial Cells: Application to Tropism Study. *PLoS One*. 2017 Jan 6;12(1):e0169453.
- Teweldemedhin M, Asres N, Gebreyesus H, Asgedom SW. Tuberculosis-Human Immunodeficiency Virus (HIV) co-infection in Ethiopia: a systematic review and meta-analysis. *BMC Infect Dis*. 2018 Dec 18;18(1):676.
- Thiébaud R, Pellegrin I, Chêne G, Viallard JF, Fleury H, Moreau JF, et al. Immunological markers after long-term treatment interruption in chronically HIV-1 infected patients with CD4 cell count above 400 x 10⁶ cells/l. *AIDS*. 3 janv 2005;19(1):53-61.
- Timofeeva AV, Skrypina NA. Background activity of reverse transcriptases. *BioTechniques*. janv 2001;30(1):22-4, 26, 28.
- Tokarev A, Suarez M, Kwan W, Fitzpatrick K, Singh R, Guatelli J. Stimulation of NF- κ B activity by the HIV restriction factor BST2. *J Virol*. févr 2013;87(4):2046-57.
- Tomaras GD, Haynes BF. HIV-1-specific antibody responses during acute and chronic HIV-1 infection: Current Opinion in HIV and AIDS. sept 2009;4(5):373-9.

- Tomaras GD, Yates NL, Liu P, Qin L, Fouda GG, Chavez LL, et al. Initial B-cell responses to transmitted human immunodeficiency virus type 1: virion-binding immunoglobulin M (IgM) and IgG antibodies followed by plasma anti-gp41 antibodies with ineffective control of initial viremia. *J Virol.* déc 2008;82(24):12449-63.
- Torresilla C, Larocque E, Landry S, Halin M, Coulombe Y, Masson J-Y, et al. Detection of the HIV-1 Minus-Strand-Encoded Antisense Protein and Its Association with Autophagy. *Journal of Virology.* 1 mai 2013;87(9):5089-105.
- Tryoen-Tóth P, Chasserot-Golaz S, Tu A, Gherib P, Bader M-F, Beaumelle B, et al. HIV-1 Tat protein inhibits neurosecretion by binding to phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *J Cell Sci.* 15 janv 2013;126(Pt 2):454-63.
- Usami Y, Wu Y, Göttlinger HG. SERINC3 and SERINC5 restrict HIV-1 infectivity and are counteracted by Nef. *Nature.* 8 oct 2015;526(7572):218-23.
- Van Damme N, Goff D, Katsura C, Jorgenson RL, Mitchell R, Johnson MC, et al. The interferon-induced protein BST-2 restricts HIV-1 release and is downregulated from the cell surface by the viral Vpu protein. *Cell Host Microbe.* 17 avr 2008;3(4):245-52.
- Van de Perre P. Transfer of antibody via mother's milk. *Vaccine.* 28 juill 2003;21(24):3374-6.
- Van de Perre P, Hitimana DG, Lepage P. Human immunodeficiency virus antibodies of IgG, IgA, and IgM subclasses in milk of seropositive mothers. *J Pediatr.* déc 1988;113(6):1039-41.
- Van de Perre P, Rubbo P-A, Viljoen J, Nagot N, Tylleskar T, Lepage P, et al. HIV-1 Reservoirs in Breast Milk and Challenges to Elimination of Breast-Feeding Transmission of HIV-1. *Science Translational Medicine.* 18 juill 2012;4(143):143sr3-143sr3.
- Van de Perre P, Simonon A, Karita E, Butera J-B, Hitimana D-G, Mukamabano B, et al. Infective and anti-infective properties of breastmilk from HIV-1-infected women. *The Lancet.* 10 avr 1993;341(8850):914-8.
- Van Heuverswyn F, Li Y, Neel C, Bailes E, Keele BF, Liu W, et al. Human immunodeficiency viruses: SIV infection in wild gorillas. *Nature.* 9 nov 2006;444(7116):164.
- Van Lint C, Bouchat S, Marcello A. HIV-1 transcription and latency: an update. *Retrovirology.* 26 juin 2013;10:67.
- Vandergeeten C, Fromentin R, Chomont N. The role of cytokines in the establishment, persistence and eradication of the HIV reservoir. *Cytokine Growth Factor Rev.* oct 2012;23(4-5):143-9.
- Vandergeeten C, Fromentin R, DaFonseca S, Lawani MB, Sereti I, Lederman MM, et al. Interleukin-7 promotes HIV persistence during antiretroviral therapy. *Blood.* 23 mai 2013;121(21):4321-9.
- Vanhée-Brossollet C, Thoreau H, Serpente N, D'Auriol L, Lévy J-P, Vaquero C. A natural antisense RNA derived from the HIV-1 env gene encodes a protein which is recognized by circulating antibodies of HIV+ individuals. *Virology.* janv 1995;206(1):196-202.
- Vendeville A, Rayne F, Bonhoure A, Bettache N, Montcourrier P, Beaumelle B. HIV-1 Tat enters T cells using coated pits before translocating from acidified endosomes and eliciting biological responses. *Mol Biol Cell.* mai 2004;15(5):2347-60.

- Vergnon-Miszczycha D, Lucht F, Roblin X, Pozzetto B, Paul S, Bourlet T. Infection par le virus de l'immunodéficience humaine: Rôle majeur du tissu lymphoïde de la muqueuse digestive (GALT). *médecine/sciences*. déc 2015;31(12):1092-101.
- Voltersvik P, Albrektsen G, Ulvestad E, Dyrhol-Riise A, Sørensen B, Åsjö B. Changes in Immunoglobulin Isotypes and Immunoglobulin G (IgG) Subclasses During Highly Active Antiretroviral Therapy: Anti-p24 IgG1 Closely Parallels the Biphasic Decline in Plasma Viremia. *JAIDS Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*. déc 2003;34(4):358-67.
- Wagner TA, McLaughlin S, Garg K, Cheung CYK, Larsen BB, Styrchak S, et al. HIV latency. Proliferation of cells with HIV integrated into cancer genes contributes to persistent infection. *Science*. 1 août 2014;345(6196):570-3.
- Walker BD, Burton DR. Toward an AIDS Vaccine. *Science*. 9 mai 2008;320(5877):760-4.
- Wang L, Mukherjee S, Jia F, Narayan O, Zhao LJ. Interaction of virion protein Vpr of human immunodeficiency virus type 1 with cellular transcription factor Sp1 and trans-activation of viral long terminal repeat. *J Biol Chem*. 27 oct 1995;270(43):25564-9.
- Wang YE, Li B, Carlson JM, Streeck H, Gladden AD, Goodman R, et al. Protective HLA class I alleles that restrict acute-phase CD8+ T-cell responses are associated with viral escape mutations located in highly conserved regions of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol*. févr 2009;83(4):1845-55.
- Weinelt J, Neil SJD. Differential Sensitivities of Tetherin Isoforms to Counteraction by Primate Lentiviruses. *J Virol*. mai 2014;88(10):5845-58.
- Wertheim JO, Worobey M. Dating the age of the SIV lineages that gave rise to HIV-1 and HIV-2. *PLoS Comput Biol*. mai 2009;5(5):e1000377.
- Wheeler TT, Hodgkinson AJ, Prosser CG, Davis SR. Immune Components of Colostrum and Milk—A Historical Perspective. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*. 27 nov 2007;12(4):237-47.
- WHO Guideline. WHO | Guideline on when to start antiretroviral therapy and on pre-exposure prophylaxis for HIV. WHO 2015.
- Wilflingseder D, Banki Z, Garcia E, Pruenster M, Pfister G, Muellauer B, et al. IgG opsonization of HIV impedes provirus formation in and infection of dendritic cells and subsequent long-term transfer to T cells. *J Immunol*. 15 juin 2007;178(12):7840-8.
- Wittner M, Dunay GA, Kummer S, Bockhorn M, Hufner A, Schmiedel S, et al. CD32 Expression of Different Memory T Cell Subpopulations in the Blood and Lymph Nodal Tissue of HIV Patients and Healthy Controls Correlates With Immune Activation. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 01 2018;77(4):345-9.
- Wong JK, Hezareh M, Günthard HF, Havlir DV, Ignacio CC, Spina CA, et al. Recovery of replication-competent HIV despite prolonged suppression of plasma viremia. *Science*. 14 nov 1997;278(5341):1291-5.
- Wong-Staal F, Chanda PK, Ghayeb J. Human Immunodeficiency Virus: The Eighth Gene. *AIDS Research and Human Retroviruses*. janv 1987;3(1):33-9.

- World Health Organization 2017. WHO | Preventing HIV during pregnancy and breastfeeding in the context of PrEP. WHO 2017.
- Worobey M, Gemmel M, Teuwen DE, Haselkorn T, Kunstman K, Bunce M, et al. Direct evidence of extensive diversity of HIV-1 in Kinshasa by 1960. *Nature*. 2 oct 2008;455(7213):661-4.
- Worobey M, Watts TD, McKay RA, Suchard MA, Granade T, Teuwen DE, et al. 1970s and « Patient 0 » HIV-1 genomes illuminate early HIV/AIDS history in North America. *Nature*. 03 2016;539(7627):98-101.
- Yamada T, Iwamoto A. Comparison of proviral accessory genes between long-term nonprogressors and progressors of human immunodeficiency virus type 1 infection. *Arch Virol*. 2000;145(5):1021-7.
- Yamaguchi J, Bodelle P, Vallari AS, Coffey R, McArthur CP, Schochetman G, et al. HIV infections in northwestern Cameroon: identification of HIV type 1 group O and dual HIV type 1 group M and group O infections. *AIDS Res Hum Retroviruses*. sept 2004;20(9):944-57.
- Yang C, Li M, Newman RD, Shi Y-P, Ayisi J, van Eijk AM, et al. Genetic diversity of HIV-1 in western Kenya: subtype-specific differences in mother-to-child transmission. *AIDS*. 25 juill 2003;17(11):1667-74.
- Yap MW, Nisole S, Lynch C, Stoye JP. Trim5 α protein restricts both HIV-1 and murine leukemia virus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 20 juill 2004;101(29):10786-91.
- Younas M, Psomas C, Reynes J, Corbeau P. Immune activation in the course of HIV-1 infection: Causes, phenotypes and persistence under therapy. *HIV Medicine*. 2016;17(2):89-105.
- Yu X, Yu Y, Liu B, Luo K, Kong W, Mao P, et al. Induction of APOBEC3G ubiquitination and degradation by an HIV-1 Vif-Cul5-SCF complex. *Science*. 7 nov 2003;302(5647):1056-60.
- Yu XF, Ito S, Essex M, Lee TH. A naturally immunogenic virion-associated protein specific for HIV-2 and SIV. *Nature*. 15 sept 1988;335(6187):262-5.
- Yuan X, Matsuda Z, Matsuda M, Essex M, Lee TH. Human immunodeficiency virus vpr gene encodes a virion-associated protein. *AIDS Res Hum Retroviruses*. nov 1990;6(11):1265-71.
- Zagury JF, Sill A, Blattner W, Lachgar A, Le Buanec H, Richardson M, et al. Antibodies to the HIV-1 Tat protein correlated with nonprogression to AIDS: a rationale for the use of Tat toxoid as an HIV-1 vaccine. *J Hum Virol*. juin 1998;1(4):282-92.
- Zapata JC, Campilongo F, Barclay RA, DeMarino C, Iglesias-Ussel MD, Kashanchi F, et al. The Human Immunodeficiency Virus 1 ASP RNA promotes viral latency by recruiting the Polycomb Repressor Complex 2 and promoting nucleosome assembly. *Virology*. juin 2017;506:34-44.
- Zhang F, Wilson SJ, Landford WC, Virgen B, Gregory D, Johnson MC, et al. Nef proteins from simian immunodeficiency viruses are tetherin antagonists. *Cell Host Microbe*. 23 juill 2009;6(1):54-67.
- Zhang H, Yang B, Pomerantz RJ, Zhang C, Arunachalam SC, Gao L. The cytidine deaminase CEM15 induces hypermutation in newly synthesized HIV-1 DNA. *Nature*. 3 juill 2003;424(6944):94-8.

Zhang W, Morshed MM, Noyan K, Russom A, Sönnnerborg A, Neogi U. Quantitative humoral profiling of the HIV-1 proteome in elite controllers and patients with very long-term efficient antiretroviral therapy. *Sci Rep.* 2017 Apr 6;7(1):666.

ASP, la Protéine AntiSens du VIH-1 :

Etude de ses transcrits et de la réponse anticorps anti-ASP chez le patient

Le VIH-1 possède sur le brin antisens de son génome proviral un gène codant pour une protéine nommée ASP (*Antisense Protein*). Le gène codant pour ASP est uniquement conservé dans le groupe M du VIH-1 responsable de la pandémie, ce qui suggère fortement l'implication d'ASP et de ses transcrits dans la virulence ou la propagation du VIH-1. Plusieurs études ont rapporté l'expression de transcrits antisens du VIH-1 et de la protéine ASP dans des cellules infectées *in vitro* et *ex vivo*. Cependant, malgré ces avancées, l'expression d'ASP chez le patient reste contestée, et les informations concernant sa fonction potentielle sont limitées. **Afin d'appuyer l'existence d'ASP et de ses transcrits *in vivo* et d'améliorer notre compréhension de leur expression chez le patient, j'ai étudié les transcrits d'*asp* et la réponse anticorps anti-ASP dans des échantillons biologiques de patients infectés par le VIH-1.** J'ai développé une technique basée sur l'immuno-précipitation de la protéine de fusion nanoluciférase-ASP pour détecter les anticorps anti-ASP, ainsi qu'une technique de RT-qPCR brin-spécifique pour détecter les transcrits d'*asp*. A l'aide de ces deux techniques, j'ai détecté la présence de transcrits d'*asp* dans les cellules isolées de 2 patients, et la présence d'anticorps anti-ASP dans le plasma de 4 patients. Chez ces 4 patients, la réponse anticorps anti-ASP fluctue au cours du temps et cible un ou plusieurs épitopes conservés d'ASP. Dans l'ensemble, mes résultats démontrent que le gène *asp* est exprimé au cours de l'infection par le VIH-1, et confirment l'immunogénicité de différents domaines de la protéine ASP. Bien que l'étude d'un petit nombre de patients ne permette pas d'analyser la protection éventuellement conférée par la réponse anticorps anti-ASP, la compréhension des paramètres immuno-virologiques qui gouvernent les fluctuations de cette réponse anticorps chez le patient pourrait avoir d'intéressantes retombées thérapeutiques.

ASP, the AntiSense Protein of HIV-1:

Study of its transcripts and of the antibody response anti-ASP in patients

HIV-1 presents a gene encoding for a protein named ASP (AntiSense Protein) on the antisense strand of its proviral genome. The gene encoding ASP is uniquely conserved within the M group of HIV-1 responsible for the pandemic, which strongly suggests the implication of ASP and its transcripts in HIV-1 virulence or spreading. Several studies reported the expression of HIV-1 antisense transcripts and of ASP protein in cells infected *in vitro* and *ex vivo*. Despite these progress however, the expression of ASP in patients remains a subject of debate, and limited information is available on its potential function. **To support the *in vivo* expression of ASP and its transcripts, and to improve our understanding of its expression in patients, I studied *asp* transcripts and the antibody response anti-ASP in biologic samples from HIV-1 infected patients.** I developed a technic based on the immuno-precipitation of a nanoluciferase-ASP fusion protein to detect anti-ASP antibodies, and a strand-specific RT-qPCR to detect *asp* transcripts. Using both technics, I detected *asp* transcrits in the cells isolated from 2 patients, and the presence of anti-ASP antibodies in the plasma of 4 patients. In these 4 patients, the anti-ASP antibody response fluctuates overtime and targets one or several conserved epitopes of ASP. Overall, my results demonstrate that the *asp* gene is expressed during HIV-1 infection and confirm the immunogenicity of different domains of ASP. Even though the study of a small number of patients does not allow assessing the eventual protection conferred by the anti-ASP antibody response, the comprehension of the immuno-virological parameters underlying its fluctuations in patients could have interesting therapeutic implications.