

Etude de la diversité génétique du réservoir au cours de l'infection par le VIH-1

Basma Abdi

► To cite this version:

Basma Abdi. Etude de la diversité génétique du réservoir au cours de l'infection par le VIH-1. Virologie. Sorbonne Université, 2021. Français. NNT: 2021SORUS184 . tel-03482147

HAL Id: tel-03482147 https://theses.hal.science/tel-03482147

Submitted on 15 Dec 2021

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 de Doctorat de Sorbonne Université

Ecole doctorale Complexité du vivant – ED515

Laboratoire de Virologie, APHP GHU Pitié-Salpêtrière – Charles-Foix Institut Pierre Louis d'Epidémiologie et de Santé Publique (iPLESP) - Inserm UMR_S 1136

Etude de la diversité génétique du réservoir au cours de l'infection par le VIH-1

Par Madame Basma ABDI

Dirigée par Madame Cathia SOULIE

Présentée et soutenue publiquement le 23 septembre 2021

Devant un jury composé de :Président du jury :Pr Gilles PIALOUX, PU-PHRapporteur :Pr Charlotte CHARPENTIER, PU-PHRapporteur :Pr Slim FOURATI, PU-PHExaminateur :Pr Anne-Geneviève MARCELIN, PU-PHExaminateur :Dr Olivier DELELIS, DRCDirectrice de thèse :Dr Cathia SOULIE, IR

REMERCIEMENTS

Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance à Monsieur le Professeur **Vincent Calvez** et Madame le Professeur **Anne-Geneviève MARCELIN** qui m'ont accueillie dans le laboratoire de Virologie de l'hôpital la Pitié Salpêtrière. Je vous remercie pour vos conseils et votre soutien.

Je remercie chaleureusement Monsieur le Professeur **Gilles PIALLOUX** d'avoir accépté de presider mon jury de thèse.

Un grand merci à Madame le Professeur **Charlotte CHARPENTIER** et Monsieur le Professeur **Slim FOURATI** pour avoir accépté d'être les rapporteurs de cette thèse.

Je remercie Madame le Professeur **Anne-Geneviève MARCELIN** et Monsieur le Docteur **Olivier DELELIS** pour avoir accépté d'être les examinateurs de cette thèse.

A ma directrice de thèse **Cathia SOULIE**, je te remercie sincèrement pour tes précieux conseils, ton soutien et ta disponibilité tout au long ces années de thèse.

Un très grand merci à **Marc WIRDEN** de m'avoir formée et initiée à la recherche dans le domaine du VIH. Merci pour tes précieux conseils et tes remarques constructives.

Je remercie l'ensemble des techniciens du laboratoire de Virologie pour leur investissement quotidien dans le bon déroulement du service de Virologie et dans la realisation des projets de recherche.

Merci à toute l'équipe de recherche du laboratoire de Virologie pour leur aide précieuse pour la réalisation de cette thèse.

Je remercie également tous les médecins des Maladies Infectieuses et Tropicales pour nos différentes collaborations dans différents projets scientiques.

Enfin, un grand merci aux patients qui acceptent de participer à la recherche. Ces travaux n'existeraient pas sans eux.

A mes parents,

A ma soeur,

A mes frères,

A tous mes amis,

Je vous dédie ce travail en témoignage de mon amour éternel.

Un grand Merci pour votre amour et votre soutien

SOMMAIRE

S	OM	MAI	RE	4
L	IST	E DI	ES ABREVIATIONS	6
T	TABLE DES ILLUSTRATIONS10			
1	т	Jonn	áss Enidámiologiques	11
1. 2		Struc	tura at arganisation génomique du VIH-1	11
2.	2 1	Stri	acture des VIH	1 <i>4</i>
	2.1	Org	anisation génomique du VIH-1	14
2		Juor		16
з.	21		E DE REPLICATION VIRAL ET FACTEURS DE RESTRICTION CELLULAIRE	10
	3.1	Ent	ree du virus dans la cellule cible	1/
	3.2	Dec	capsidation et retrotranscription	18
	3.3	Inté	gration du génome viral	20
	3.4	Tra	nscription du génome viral	21
	3.5	Tra	duction des ARN messagers et assemblage des protéines	21
	3.6	Βοι	argeonnement et maturation des particules virales	22
4.	(Cibli	ES THERAPEUTIQUES ET RESISTANCE AUX ANTIRETROVIRAUX	23
	4.1	Les	inhibiteurs de l'entrée, de l'attachement et de la fusion	24
	4.2	Les	inhibiteurs de la transcriptase inverse	25
	4.3	Les	inhibiteurs de l'intégrase	27
	4.4	Les	inhibiteurs de la protéase	28
	4.5	Les	autres antirétroviraux	28
5.	I	HISTO	DIRE NATURELLE DE LA MALADIE	30
	5.1	Prir	no-infection à VIH-1	30
	5	5.1.1	Réponse immunitaire au cours de la primo-infection	30
	5	5.1.2	Aspects cliniques	35
	5	5.1.3	Les stades de la primo-infection à VIH	36
	5.2	S	TADE CHRONIQUE	37

6.	L	es ré	servoirs du VIH	
	6.1	Etab	blissement du réservoir viral	
	6	.1.1	Le réservoir cellulaire	
	6	.1.2	Le réservoir tissulaire	46
	6.2	Ana	lyse quantitative du réservoir viral	49
	6	.2.1	ADN VIH total	51
	6	.2.2	ADN VIH intégré	
	6	.2.3	ADN VIH non intégré	54
	6	.2.4	Autres formes du réservoir viral	55
	6	.2.5	Provirus intact inductible	55
	6.3	А	NALYSE QUALITATIVE DU RESERVOIR VIRAL	58
	6.4	Mar	queurs cellulaires du réservoir	59
	6.5	Dyn	amique du réservoir viral au cours de l'infection VIH	61
	6	.5.1	Evolution en histoire naturelle de l'infection	61
	6	.5.2	Evolution du réservoir sous traitement antirétroviral	64
	6	.5.3	Particularité des patients contrôleurs	66
7	A	polip	poprotein B mRNA-Editing Catalytic Polypeptide-like	69
8	S	traté	gies thérapeutiques de guérison de l'infection VIH	74
TF	RAV	/AUX	X PERSONNELS	
1.	0	bjec	tifs	79
2.	R	lésult	ats / Articles	
	2.1	Arti	cle 1	
	2.2	Arti	cle 2	97
	2.3	Arti	cle 3	105
3.	D	OISCU	USSION ET PERSPECTIVES	115
BI	BL I	IOG	RAPHIE	127
LI	STI	E DE	S PUBLICATIONS	177

Liste des abréviations

3TC	Lamivudine
А	Adénine
ABC	Abacavir
ADN	Acide Désoxyribonucléique
AgP24	Antigène P24
	Agence Nationale de Recherche sur le Sida et les hépatites virales-Maladies
ANRS-MIE	Infectieuses Emergentes
APD	Average Pairwise Distance
APE	Apurinic/Apyrimidinic Endonuclease
APOBEC	Apolipoprotein B mRNA Editing Catalytic Polypeptide-like
ARN	Acide Ribonucléique
ART	Antirétroviral
ATP	Adénosine 5' Triphosphate
ATV	Atazanavir
AZT	Zidovudine
BAFF	B-cell Activating Factor
BALT	Bronchus-Associated Lymphoid Tissue
BHE	Barrière Hématoencéphalique
BIC	Bictegravir
bNAbs	broadly Neutralizing Antibodies
С	Cytosine
CA	Capside
CAB	Cabotegravir
CA-HIV-RNA	Cell Associated HIV
CAR T cells	Chimeric Antigen Receptor-modified T cells
CBFβ	Core-Binding Factor beta
CCR5	C-Chemokine Receptor type 5
CD	Cellule dendritique
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
CH25H	Cholésterol-25-Hydroxylase
cpAg	Cellule présentatrice de l'Antigène
cPPT	Central PolyPurine Tract
CRISPR-Cas9	CRISPR associated protein 9
CRL5	Cullin–RING Ligase 5
CSH	Cellules Souches Hématopoïétique
CTLA4	Cytotoxic T Lymphocyte Antigen 4

Cullin 5
Charge Virale
Charge Virale plasmatique
C-X-C Motif Chemokine Ligand 13
Chemokine Receptor type 4
Stavudine
Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing-Nonintegrin
Droplet Digital PCR (PCR digitale en gouttelettes)
Doravirine
Drug Resistance Associated Mutation
Darunavir
Dolutegravir
Efavirenz
Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
Elongin B
Elongin C
Etravirine
Elvitegravir
Facteur de Restriction Cellulaire
Emtricitabine
Guanine
Gut-Associated Lymphoid Tissue
Guanylate Binding Protein 5
Glycoprotéine
HIV controller
Hommes ayant des relations Sexuelles avec des Hommes
Intervalle de Confiance
INF Inducible Transmembranaire
Interleukine
IL-1 Receptor Antagonist
Intégrase
Interféron
Inhibiteur Non Nucléosidique de la Transcriptase Inverse
Integrase Strand Transfer Inhibitor
Inhibiteur Nucléosi(ti)dique de la Transcriptase Inverse
Inhibiteur de la Protéase
Interferon gamma-induced Protein 10
Interquartile Range
Lymphocyte Activation Gene 3 protein
Lymphocyte B

LCR	Liquide Céphalo-Rachidien
LN	Ganglions Lymphatiques
LPV	Lopinavir
LRA	Latency Reversing Agent
LT CD4+	Lymphocytes T CD4+
LTR	Long Terminal Repeat
MA	Matrice
MCP-1	Monocyte Chemoattractant Protein 1
MIG	Monokine Induced by Gamma interferon
Mov10	Moloney leukemia Virus 10
MVOA	Murine Viral Outgrowth Assay
MX2	Myxovirus Resistance Protein
NC	Nucléocapside
NGS	Next-Generation Sequencing
NK	Lymphocyte Natural Killer
NPC	Nuclear Pore Complex
NVP	Névirapine
P21	Protéine 21
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear cell
PBS	Primer Binding Site
PCR	Polymerase Chain Reaction
PD-1	Programmed cell Death protein 1
PFGE	Pulsed-Field Gel Electrophoresis
PHA	Phytohémagglutinine
PHI	Primo-Infection par le VIH
PIC	Complexe de Pré-Intégration
PM	Poids Moléculaire
Ppi	Pyrophosphate
PR	Protéase
PTC	Post-Treatment Controller
pTEFb	Positive Transcription Elongation Factor
PVVIH	Personne Vivant avec le VIH
qPCR	Quantitative Polymerase Chain Reaction
QVOA	Quatitative Viral Out Growth Assay
RAL	Raltegravir
RBX2	RING-Box 2
RPV	Rilpivirine
RRE	Rev Recognition Element
RT	Rétrotranscriptase
RTV	Ritonavir

SAMHD1	Sterile Alpha Motif Histidine-Aspartic Domain Protein 1
SERINC	Serine Incorporator Protein Family
SIDA	Syndrome d'Immunodéficience Acquise
SLFN1	Sclafen 11
SNC	Système Nerveux Central
sRNA	spliced RNA
Т	Thymine
TAF	Ténofovir Alafénamide
TALENs	Transcription Activator-Like Effector Nucleases
TAMs	Thymidine Analog Mutations
TAR	Trans-Responsive element
TCM	Central Memory T-cell
TDF	Ténofovir Disproxil Fumarate
TEM	Effector Memory T-cell
Tfh	Lymphocyte T folliculaire
Th	Lymphocyte T helper
TI	Transcriptase Inverse
TIGIT	T cell Immunoglobulin and ITIM domain
TILDA	tat/rev Induced Limiting Dilution Assay
TIM3	T cell immunoglobulin and mucin 3
TN	Lymphocyte Naif
TNF	Tumor Necrosis Factor
TPV	Tipranavir
Treg	Lymphocyte T régulateur
TRIM5a	Tripartite Motif-Containing 5α
TSCM	Stem Cell Memory T-cell
TTM	Transitional Memory T-cell
U	Uracile
UDI	Usagers de Drogues Injectables
UNG2	Uracil DNA Glycosylases-2
usRNA	Unspliced RNA
VIH-1	Virus de l'Immunodéficience Humaine de type 1
VISCONTI	Viro-Immunological Sustained CONtrol after Treatment Interruption
WB	Western-Blot
ZAP	Zinc-finger Antiviral Protein

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1. Prévalence mondiale de l'infection des adultes par le VIH12
Figure 2: Nombre de découvertes de séropositivité VIH en France par mode de contamination
Figure 3: Structure du virus de l'immunodéficience humaine de type 1 (VIH-1) 15
Figure 4: Organisation génomique du VIH-116
Figure 5: Rétrotranscription du génome du VIH-119
Figure 6: Cycle de réplication du VIH-1 et facteurs de restriction cellulaire
Figure 7: Cibles Thérapeutiques des Antirétroviraux
Figure 8: Cinétique de production des cytokines au cours de la primo-infection VIH-1 31
Figure 9: Stades de la primo-infection VIH-1 selon la classification de Fiebig
Figure 10: Les réservoirs du VIH-1
Figure 11: Proportions des différents défauts génétiques au niveau du provirus VIH-141
Figure 12: Différentes sous-populations lymphocytaires CD4+ et leur contribution à la
formation du réservoir du VIH
Figure 13: Classification fonctionnelle des lymphocytes T CD4+
Figure 14: Les différentes formes d'ADN VIH et les méthodes permettant de les détecter ou
de quantifier leurs produits
Figure 15: Méthode de quantification de l'ADN VIH intégré par la technique de PCR Alu-
LTR
Figure 16: Représentation schématique des différentes formes d'ADN VIH quantifiables par
PCR
Figure 17: Schématisation du test de culture cellulaire quantitatif Viral Outgrowth Assay 57
Figure 18: Charge virale ADN total sanguine dans différentes situations cliniques
Figure 19: Mécanisme d'action des APOBEC3 au cours du cycle de la réplication du VIH72

INTRODUCTION ET DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Données Epidémiologiques

Le virus de l'immunodéficience humaine de type 1 (VIH-1) a été découvert en 1983 par Françoise Barré-Sinoussi et ses collègues de l'Institut Pasteur en France (Barré-Sinoussi et al. 1983). Décrit pour la première fois aux États-Unis en 1981 chez des hommes ayant des relations sexuelles avec des hommes (HSH), ce virus a été initialement nommé virus associé à la lymphadénopathie causant le syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA) (Gottlieb et al. 1981). En 1986, l'isolement d'un nouveau virus très divergent du premier conduisit à une révision taxonomique définissant les HIV (Human Immunodeficiency Virus) de type 1 (HIV-1) et de type 2 (HIV-2) (Clavel et al. 1986).

L'infection par le VIH demeure un problème de santé publique majeur causant la mort de 32,7 millions de personnes des suites de maladies liées au SIDA depuis le début de l'épidémie. En 2019, 38 millions (36,2 millions d'adultes et 1,8 million d'enfants) de personnes vivaient avec le VIH (PVVIH). La prévalence globale des adultes vivant avec le VIH est estimée à 0,7% (cf. Figure 1). Le nombre de nouvelles infections par le VIH est évalué aujourd'hui à 1,8 million contre 2,8 millions en 1998 et le nombre de morts liés à cette infection est égal à 690 mille personnes (WHO 2020; UNAIDS, 2020). Ces chiffres cachent néanmoins de fortes disparités régionales, avec plus de deux tiers des personnes séropositives vivant en Afrique Subsaharienne suivie de l'Asie et du Pacifique (UNAIDS. 2020; Global Health Policy. 2020) (cf. Figure 1).

En Juin 2020, seulement 26 millions de personnes avaient accès à la thérapie antirétrovirale, un nombre encore loin des objectifs de l'ONUSIDA (90-90-90), à savoir dépister 90 % des PVVIH, accès au traitement antirétroviral à 90 % des personnes dépistées, obtention d'une charge virale plasmatique (CVp) supprimée (inférieure à 50 copies/mL) chez 90 % des individus traités (UNAIDS. 2020).



Figure 1. Prévalence mondiale de l'infection des adultes par le VIH

Les prévalences de l'infection par le VIH dans chacune des régions du monde définies par UNIADS, présentées sur la carte ci-dessus, correspondent aux nombres suivants de personnes vivant avec le VIH : Afrique du Sud et de l'Est : 20,7 millions, Afrique Centrale et de l'Ouest : 4,9 millions, Asie et le Pacifique : 5,8 millions, Europe Centrale, Europe de l'Ouest et Amérique du Nord : 2,2 millions, Amérique Latine : 2,1 millions, Europe de l'Est et Asie Centrale : 1,7 million, Les Caraïbes : 330 000, Afrique du Nord et Moyen Orient : 240 000 (estimations réalisées à partir des données de 2019) (Global Health Policy. 2020).

En France, la région Île-de-France, la Guyane et les Antilles sont les territoires les plus touchés. D'après les données de 2016, le nombre de PVVIH est estimé à 172 700 personnes dont 14% ignoreraient leur statut sérologique (Santé Publique France. 2020).

En 2018, le nombre de découvertes de séropositivité VIH avait été estimé à 6 200, avec une diminution de 7% par rapport à 2017. Ce nombre n'a pas encore pu être estimé pour l'année 2019 en raison des difficultés liées au contexte sanitaire en 2020.

Selon les données au 31/03/2019 corrigées pour les délais de déclaration et la sousdéclaration, le nombre de découvertes de séropositivité a diminué depuis plusieurs années chez les HSH nés en France (-16% entre 2013 et 2018), tandis qu'il a augmenté de manière continue chez ceux nés à l'étranger (+38% sur la même période). Chez les hétérosexuel(le)s né(e)s à l'étranger, une diminution du nombre de découvertes a été observée chez les hommes (-14% entre 2013 et 2018), alors que ce nombre était stable chez les femmes (Santé Publique France. 2020) (cf. Figure 2). En 2019-2020, 21% des découvertes de séropositivité sont des diagnostics précoces (vs 24% en 2017-2018) dont 30 % chez les HSH, 14% chez les usagers de drogues injectables (UDI), 12% chez les hétérosexuel(le)s et 10% chez les transgenres contaminés(e)s par rapports sexuels. Ces diagnostics précoces sont plus fréquents chez les personnes nées en France que chez celles nées à l'étranger (Santé Publique France. 2020) (cf. Figure 2).

Durant la même période, les diagnostics à un stade avancé sont estimés à 26% (vs 25% en 2017-2018). Contrairement aux diagnostics précoces, ceux-ci sont plus fréquents chez les UDI (35%). Ils sont évalués à 31% chez les hétérosexuel(le)s, 20% chez les transgenres et 17% chez les HSH (Santé Publique France. 2020) (cf. Figure 2).



Figure 2: Nombre de découvertes de séropositivité VIH en France par mode de contamination et lieu de naissance

(Santé Publique France. 2020)

2. Structure et organisation génomique du VIH-1

2.1 Structure des VIH

Les VIH appartiennent à la famille des Retroviridae, à la sous-famille des Orthoretrovirinae et au genre Lentivirus (Roquebert et al. 2009). La structure du VIH-1 est identique à celle du VIH-2, seuls les poids moléculaires des protéines et enzymes sont différents. Ces rétrovirus sont des particules sphériques de 90 à 120 nm de diamètre, possédant deux protéines d'enveloppe : la glycoprotéine de surface (gp120 et gp105 pour le VIH-1 et VIH-2, respectivement) et la glycoprotéine transmembranaire (gp41 pour le VIH-1 et gp35 pour le VIH-2). Le core viral contient 2 brins d'acide ribonucléique (ARN) linéaires de polarité positive ainsi que 3 enzymes virales nécessaires au cycle de multiplication : la transcriptase inverse (TI) ou rétrotranscriptase (RT), l'intégrase (IN) et la protéase (PR). La capside conique (CA) est constituée d'une protéine interne très abondante (CA p24 et CA p26 pour le VIH-1 et VIH-2, respectivement). La protéine de nucléocapside (NC) (NC p7 pour le VIH-1 et NC p8 pour le VIH-2) est associée aux deux molécules d'ARN. La protéine la plus externe, celle de la matrice (MA) (MA p17 et MA p16 pour le VIH-1 et VIH-2, respectivement) est associée à la PR (cf. Figure 3) (Roquebert et al. 2009; Benoît Visseaux et al. 2019).



Figure 3: Structure du virus de l'immunodéficience humaine de type 1 (VIH-1)

Gp: Glycoprotéines; (Roquebert et al. 2009)

Le virus du VIH-2 est responsable d'une infection atténuée comparée à l'infection par le VIH-1. Il est caractérisé par des CVp plus faibles ainsi qu'une évolution lente vers le stade SIDA. Ces spécificités ne seront pas abordées ici ; les données qui suivent ne concernent que le VIH-1 (Benoît Visseaux et al. 2019; Nyamweya et al. 2013).

2.2 Organisation génomique du VIH-1

Le génome du VIH-1 est encadré par une région Long Terminal Repeat (LTR). Ces LTR jouent un rôle essentiel dans l'intégration et la transcription du génome viral. Entre ces deux

régions LTR se trouvent neuf gènes du VIH-1 (cf. Figure 4) (Los Alamos National Laboratory. 2018) :

- Trois gènes principaux de structure (gag, pol et env) : le gène gag code les protéines internes (NC, CA et MA) tandis que le gène pol code les 3 enzymes virales (TI, PR, IN). Le gène env code les Gp de surface et transmembranaire.
- Deux gènes de régulation (tat et rev) : tat code une protéine dite « transactivatrice » qui se lie à l'extrémité 5' du génome viral pour en favoriser la transcription, et rev qui aide à l'export des ARN messagers non épissés hors du noyau cellulaire.
- Quatre gènes dits accessoires (vif, vpr, vpu et nef) codent des protéines dont les rôles principaux sont d'augmenter l'infectiosité du VIH et/ou de contrecarrer les facteurs de restriction de l'hôte qui limitent la réplication virale à différents niveaux.



Figure 4: Organisation génomique du VIH-1

Gp : glycoprotéines, p : protéines, l'illustration du génome du VIH-1 HXB2 est réalisée d'après (Korber et al. 1998)

3. CYCLE DE REPLICATION VIRAL ET FACTEURS DE RESTRICTION CELLULAIRE

La multiplication du VIH-1 dans l'organisme a lieu dans les cellules de différents liquides biologiques (sang, sécrétions génitales, lait...), et de nombreux tissus (ganglions lymphatiques, rate, intestin, cerveau...).

Les lymphocytes T CD4+ (LT CD4+) sont les principales cellules cibles du VIH-1, du fait de la présence de la molécule CD4 à leur surface cellulaire (Dalgleish et al. 1984). D'autres cellules du système immunitaire telles que les monocytes, les macrophages, les cellules dendritiques, les cellules de Langerhans...peuvent être cibles du VIH-1 (Woodham et al. 2016).

Le cycle de réplication du VIH-1 est complexe et peut être divisé en 6 grandes étapes : 1) l'entrée du virus dans la cellule hôte 2) la décapsidation et la rétrotranscription, 3) l'intégration, 4) la transcription du génome proviral, 5) la traduction des ARN messagers et l'assemblage des protéines virales et 6) le bourgeonnement et la maturation des particules virales (c*f.* Figure 6).

3.1 Entrée du virus dans la cellule cible

L'entrée du VIH-1 dans la cellule cible nécessite la liaison du récepteur cellulaire CD4 au «CD4 binding site » situé sur le trimère de Gp de surface (gp120) viral. Cette interaction, de très haute affinité, conduit au changement de conformation du trimère exposant ainsi son site de liaison (boucle hypervariable V3) au corécepteur cellulaire CCR5 (C-Chemokine receptor type 5) et/ou CXCR4 (Chemokine receptor type 4) selon le tropisme du virus (Shaik et al. 2019).

Le peptide de fusion (hétérodimère de la Gp transmembranaire, gp41), masqué par la gp120 s'insère dans la membrane cellulaire, permettant la fusion de l'enveloppe virale et de la membrane cellulaire, et la formation d'un pore de fusion au travers duquel le contenu du virion passera dans le cytoplasme de la cellule infectée (*cf.* Figure 6) (D Urbano, De Crignis, et Re 2018).

Le VIH peut aussi être transmis de cellule à cellule notamment par un mécanisme appelé « synapse virologique ». Ce mécanisme permet l'infection rapide (sans étape de la fusion virale avec la cellule hôte) de nouveaux LT par les macrophages, les cellules dendritiques ou les LT infectés (D Urbano, De Crignis, et Re 2018).

Trois facteurs de restriction cellulaire (FRC) ont été identifiés jouant un rôle important dans le blocage de cette étape de fusion : IFTIM (INF inducible transmembranaire), SERINC3 et SERINC5 (Serine Incorporator Protein Family) et CH25H (Cholésterol-25-Hydroxylase) (cf. Figure 6). Leur mécanisme exact d'inhibition de l'entrée virale n'a pas encore été élucidé, mais

plusieurs hypothèses se concentrent sur leur interférence avec le métabolisme lipidique impactant ainsi les propriétés des membranes cellulaire et virale (D Urbano, De Crignis, et Re 2018).

3.2 Décapsidation et rétrotranscription

La décapsidation est une étape nécessaire pour débuter la rétrotranscription du génome du VIH. Les FRC TRIM5 α ("tripartite motif-containing 5 α ") TRIM11 et MX2 (Myxovirus Resistance Protein) peuvent interférer avec la décapsidation en se fixant sur la capside virale et en la déstabilisant (*cf.* Figure 6). Cette famille protéique active l'immunité innée en stimulant la voie de synthèse de l'INF (D Urbano, De Crignis, et Re 2018; Jia, Zhao, et Xiong 2015).

Immédiatement après la décapsidation, débute la rétrotranscription dans le cytoplasme de la cellule hôte. Cette étape est orchestrée par le complexe de la TI afin de convertir l'ARN simple brin en acide désoxyribonucléique (ADN) double brin. La TI est un hétérodimère composé de deux protéines (p66 et p51), assurant les activités de la polymérase (ADN-polymérase ADN- et ARN-dépendante) et de la RNAse H (D Urbano, De Crignis, et Re 2018; Hu et Hughes 2012).

La rétrotranscription se déroule principalement en trois étapes : 1) la synthèse d'un brin d'ADN de polarité négative, 2) la dégradation de l'ARN et 3) la synthèse d'un brin d'ADN de polarité positive.

Les extrémités du génome viral (LTR) sont caractérisées par la présence d'un motif spécifique constitué d'une région répétitive (R) et d'une région unique différente U5 et U3 des deux extrémités respectives 5' et 3' (cf. Figure 5). La TI se fixe sur le brin d'ARN, sur la séquence PBS (Primer Binding Site) située immédiatement en aval de la région LTR 5' et débute la synthèse d'un ADN de polarité négative (cf. Figure 5-A, B). Par hybridation à la séquence (R) située à l'extrémité 3', la TI fait son premier saut et reprend la synthèse de l'ADN viral (cf. Figure 5, C). Parallèlement à ce processus, la RNAse H dégrade le brin d'ARN (cf. Figure 5, C) sauf deux régions riches en purine : le cPPT (central PolyPurine Tract) et le 3'PPT. Ces PPT servent d'amorces pour la synthèse du brin d'ADN de polarité positive et seront éliminées par la suite (cf. Figure 5, E, F) (Hu et Hughes 2012).

Ce processus de rétrotranscription produit deux brins d'ADN plus longs que l'ARN viral dont les extrémités contiennent des séquences U3-R-U5 servant par la suite à l'intégration du provirus dans le génome cellulaire (*cf.* Figure 5, G) (Hu et Hughes 2012).



Figure 5: Rétrotranscription du génome du VIH-1

L'ARN du VIH-1 est schématisé en bleu clair. La transcriptase inverse (TI) génère le brin d'ADN schématisé en bleu foncé. L'activité de la RNAse H de la (TI) dégrade l'ARN viral schématisé en ligne pointillée. La séquence ppt, riche en purine (adjacente à U3) résiste à la RNAse H et sert d'amorce pour la synthèse du brin d'ADN de polarité positive (Hu et Hughes 2012).

Quatre FRC de la rétrotranscription ont été décrits : SAMHD1 (Sterile Alpha Motif Histidine-Aspartic Domain Protein 1), P21 (CDKN1A), Mov 10 (MOloney leukemia Virus 10) et les protéines APOBEC3G/F (Apolipoprotein B mRNA-Editing Catalytic Polypeptide-like) (*cf.* Figure 6).

La protéine SAMHD1 réduit le pool intracellulaire en dNTP indispensable pour la synthèse des acides nucléiques. L'expression du SAMHD1 est ubiquitaire mais son activité restrictive de la réplication du VIH-1 est observée seulement au niveau des monocytes, des macrophages et des cellules dendritiques (D Urbano, De Crignis, et Re 2018; Jia, Zhao, et Xiong 2015).

La P21 est un inhibiteur des kinases dépendante des cyclines, famille de protéines jouant un rôle important dans la régulation du cycle cellulaire et de l'apoptose. Le mécanisme de restriction par la P21 de la multiplication du VIH-1 dans les cellules souches hématopoïétiques n'a pas encore été clarifié mais plusieurs études sur les monocytes, les macrophages et les cellules dendritiques expliquent ce mécanisme par la régulation du stock du dNTP cellulaire (D Urbano, De Crignis, et Re 2018).

Mov 10 aurait une activité restrictive indirecte sur la rétrotranscription. Des études récentes ont montré l'interaction avec la culline 5, composante du complexe protéasomique, qui dégrade la protéine virale Vif, protégeant ainsi la dégradation des APOBEC3.

Le mécanisme d'action des APOBEC3 et leur implication dans l'inhibition du cycle de la multiplication du VIH seront détaillés dans le chapitre 7 (cf. chapitre 7. Apolipoprotein B mRNA-Editing Catalytic Polypeptide-like).

3.3 Intégration du génome viral

L'intégration virale consiste en l'insertion de l'ADN du VIH-1 dans le génome de la cellule hôte. La première étape de ce processus consiste à la translocation dans le noyau du complexe de pré-intégration (PIC), complexe comprenant l'ADN double brin nouvellement généré, des protéines de la capside et de l'IN ainsi que des protéines cellulaires (D Urbano, De Crignis, et Re 2018).

En raison de leur taille, les PIC ne peuvent pas traverser la membrane nucléaire par simple diffusion. Ils doivent interagir avec le NPC (Nuclear Pore Complex) afin de traverser la membrane nucléaire à travers des pores nucléaires spécifiques.

L'activité exonucléasique 3' de l'IN permet le clivage de quelques nucléotides aux 2 extrémités du LTR afin de pouvoir intégrer le génome viral au génome humain préalablement clivé. L'intégration du génome viral n'est pas aléatoire, elle se fait généralement dans les gènes activement transcrits ce qui favorisera la réactivation ultérieure du génome proviral. A côté de l'ADN double brin intégré dans le génome cellulaire, il existe plusieurs formes de génome viral non intégré : ADN double brin linéaire, ADN double brin circularisé sous forme d'épisomes contenant 1 ou 2 LTR (cf. Figure 6).

MX2 est identifiée comme FRC de l'intégration. MX2 est une protéine appartenant à la superfamille des guanosines triphosphatases dont l'expression est fortement induite par INF type I et type III. En plus de son activité inhibitrice de la décapsidation, plusieurs études ont rapporté que la présence d'un taux élevé de MX2 est associé avec la présence de plusieurs formes de génomes non intégrés dans le cytoplasme cellulaire suggérant que MX2 inhibe la translocation et l'entrée des PIC à travers les pores nucléaires (cf. Figure 6) (D Urbano, De Crignis, et Re 2018).

3.4 Transcription du génome viral

Le génome rétroviral intégré peut rester à l'état latent ou être réactivé engendrant un nouveau cycle de multiplication conduisant à la formation de nouvelles particules virales. L'activité transcriptionelle du LTR est activée par des facteurs de transcription cellulaires (NFKB, SP1, Elf-1, etc). Cette activation initie le recrutement de l'ARN polymérase II cellulaire au niveau de la « TATA Box » et le début de la transcription de l'ADN en ARN viraux précoces épissés avant d'être exportés hors du noyau et traduits en 3 protéines régulatrices : Tat, Rev et Nef. La protéine Tat est l'un des deux facteurs de régulation essentiels du VIH-1. Tat transactive le LTR en se fixant sur la région TAR (Trans-Responsive element) et augmente de façon exponentielle la transcription de l'ADN viral (Los Alamos National Laboratory. 2018). La protéine virale Rev se fixe sur la région RRE (Rev Recognition Element) et permet un export plus rapide des ARN viraux du noyau au cytoplasme (Los Alamos National Laboratory. 2018).

Un FRC a été décrit altérant la transcription du promoteur viral : TRIM22 qui bloque la liaison de Sp-1 au promoteur viral empêchant ainsi l'activation de LTR et par la suite le début de la transcription (c*f*. Figure 6-B) (D Urbano, De Crignis, et Re 2018).

3.5 Traduction des ARN messagers et assemblage des protéines

Après la phase précoce de transcription, apparaissent des ARNm plus longs mono-épissés ou non épissés codant des précurseurs (Gag, Gag-Pol et Env) et des protéines matures (Vif, Vpr et Vpu). Une partie des ARN non épissés constitue l'ARN génomique, qui se dimèrise et

interagit avec des précurseurs Gag et Gag-Pol pour former des nucléocapsides immatures qui migrent vers la membrane plasmique de la cellule.

ZAP (s-finger Antiviral Protein) et SLFN1 (Sclafen 11) sont deux FRC qui entravent la traduction des ARN messagers viraux mais leur rôle exact n'a pas encore été élucidé (c*f*. Figure 6-B) (D Urbano, De Crignis, et Re 2018).

La nucléocapside s'associe à l'ARN viral et joue un rôle important dans l'encapsidation du génome. La polyproteine Env (gp160) est clivée par une protéase cellulaire en deux protéines d'enveloppe qui seront glycosylées par des enzymes cellulaires (gp120 et gp41) (*cf.* Figure 6-B).

GBP5 (Guanylate Binding Protein 5) et 90K sont deux FRC qui réduisent l'incorporation de gp120 et gp41 dans la particule virale, par contre le mécanisme exact de cette inhibition n'a pas encore été caractérisé.

3.6 Bourgeonnement et maturation des particules virales

Les particules virales acquièrent leurs Gp d'enveloppe par bourgeonnement. Au moment du bourgeonnement du virus hors de la cellule, les particules virales deviennent infectieuses après le clivage des précurseurs Gag, Gag-Pol par la protéase virale.



Figure 6: Cycle de réplication du VIH-1 et facteurs de restriction cellulaire

La première partie de la figure (A) met en évidence les facteurs de restriction cellulaire impactant les premières phases du cycle (l'entrée, la décapsidation, la transcription inverse et l'intégration) : l'IFITM, SERINC3 / 5 et CH25H bloquent la fusion virale et TRIM5 α et MX2 interfèrent avec le désassemblage. Les protéines SAMHD1, p21, Mov10 et APOBEC3 affectent spécifiquement la rétrotranscription. MX2 cible la translocation virale vers le noyau et l'intégration de l'ADN viral dans le génome de l'hôte. La deuxième partie de la figure (B) met en évidence les facteurs de restriction cellulaire qui ciblent la phase tardive de l'infection (la transcription du génome, la traduction des ARN messagers, l'assemblage des protéines virales, le bourgeonnement et la maturation des particules virales). TRIM22 altère la transcription du promoteur du virus. ZAP et SLFN1 entravent la traduction des messagers viraux. GBP5 et 90K réduisent l'incorporation de gp120 et gp41 dans la particule virale. ISG inhibe le bourgeonnement du VIH-1 à partir de la membrane cellulaire (D Urbano, De Crignis, et Re 2018).

4. CIBLES THERAPEUTIQUES ET RESISTANCE AUX ANTIRETROVIRAUX

Le progrès rapide de la découverte et du développement des antirétroviraux (ARTs) est sans précédent dans l'histoire de la médecine moderne. L'administration d'une thérapie antirétrovirale combinée permet une suppression durable de la virémie plasmatique ainsi qu'une restauration des fonctions immunitaires et une amélioration spectaculaire de la qualité de vie des patients.

Les ARTs disponibles actuellement ont pour cibles différentes protéines intervenant à différents stades du cycle viral du VIH-1 (cf. Figure 7). Néanmoins, aucun d'entre eux n'a d'effet sur l'ADN viral intégré dans le génome cellulaire qui persiste tout au long de la vie cellulaire.

4.1 Les inhibiteurs de l'entrée, de l'attachement et de la fusion

L'entrée du virus dans la cellule hôte est une étape indispensable au processus infectieux. Cette étape nécessite l'interaction de la Gp de l'enveloppe (gp120) avec le récepteur cellulaire CD4. Puis interviennent les co-récepteurs cellulaires CCR5 ou CXCR4 (selon le tropisme viral) qui vont permettre l'insertion de la Gp transmembranaire gp41 à la membrane cellulaire et par la suite la fusion des membranes virale et cellulaire.

- Le **maraviroc** est le seul représentant de la classe des antagonistes des co-récepteurs membranaires du VIH commercialisé. C'est un antagoniste sélectif, non compétitif et réversible du CCR5 (cf. Figure 7). Il empêche la liaison de la gp120 du VIH aux co-récepteurs CCR5 des chimiokines humaines et bloque ainsi l'une des étapes de l'entrée du VIH dans les cellules cibles (Carter et Keating 2007).

Un des principaux mécanismes de résistance au MVC est lié au changement de tropisme à cause de mutations au niveau de la boucle V3 de la gp120 ou suite à l'émergence des souches CXCR4 (Delgado 2008).

- L'**enfuvirtide** ou **T20** est la seule molécule de la famille des inhibiteurs de la fusion (*cf.* Figure 7). C'est un inhibiteur compétitif de la gp41. Sa structure peptidique montre une analogie avec le domaine HR2 de la gp41 et se lie au domaine voisin (HR1) de cette protéine virale dans le milieu extracellulaire, bloquant ainsi la fusion entre les membranes virale et cellulaire. Cet ART, utilisable par voie sous-cutanée, est principalement indiqué pour les individus porteurs de virus multi-résistants (Poveda, Briz, et Soriano 2005).

La résistance à l'enfuvirtide est associée à des changements des acides aminés 36 à 45 du domaine HR-1 de la gp41. Ces mutations apparaissent rapidement (en quelques semaines) en cas de réplication virale sous enfuvirtide traduisant ainsi sa faible barrière génétique et la nécessité de l'associer à d'autres ART. Des mutations sont sélectionnées plus tardivement dans HR-2, mais qui n'ont pas d'impact sur la résistance à l'enfuvirtide et sont probablement compensatrices des mutations de HR-1 pour augmenter la capacité réplicative du virus (Greenberg et Cammack 2004).

- Le **fostemsavir** prodrogue du temsavir est un nouvel inhibiteur de l'attachement. Le temsavir se lie directement à la gp120 virale bloquant son changement de conformation nécessaire à l'étape de l'entrée virale ainsi que l'infection de nouvelles cellules hôtes (Kozal et al. 2020).

Plusieurs substitutions sur la gp120 telles que S375H/I/M/N/T, M426L/P, M434I/K et M475I sont probablement impliquées dans la résistance à cet ART (Lepore et al. 2020).

4.2 Les inhibiteurs de la transcriptase inverse

Ces ARTs bloquent la TI, enzyme clef de la synthèse d'ADN complémentaire à partir de l'ARN viral avant son intégration dans le génome de la cellule hôte (cf. Figure 7). On distingue deux classes de ces ARTs qui différent par leurs structures, leurs compositions chimiques ainsi que par leurs mécanismes d'action :

Les inhibiteurs nucléosi(ti)diques de la transcriptase inverse (INTIs)

Ces INTIs sont des nucléosides modifiés, analogues des nucléosides endogènes. Dépourvus du groupement hydroxyle (OH) en position 3' du désoxyribose, ils agissent comme des terminateurs de chaîne et inhibent ainsi l'élongation de l'ADN proviral. Ces INTIs entrent en compétition avec les nucléosides endogènes pour être incorporés par la TI dans la chaîne d'ADN proviral en cours de synthèse. La multiplication du virus se trouve de ce fait, inhibée (Yoshida et al. 2020). On distingue :

✓ Les analogues nucléosidiques : ce sont des prodrogues, car dans la cellule infectée, ils subissent une tri-phosphorylation nécessaire à leur activité antirétrovirale. Les

analogues nucléosidiques commercialisés aujourd'hui en France sont : abacavir (ABC), lamivudine (3TC) et emtricitabine (FTC).

✓ Les analogues nucléotidiques : ce sont des nucléosides liés à une molécule d'acide phosphorique. Ils ne nécessitent pas une tri-phosphorylation cellulaire pour être actifs. Les analogues nucléotidiques commercialisés aujourd'hui en France sont : ténofovir disproxil fumarate (TDF) et ténofovir alafénamide (TAF).

Deux mécanismes différents sont principalement impliqués dans la résistance aux INTIs :

Le premier implique la diminution de l'affinité de la TI mutée (mutations au niveau du domaine N-terminal de la polymérase) aux analogues nucléosi(ti)diques. La TI incorpore alors beaucoup moins ces analogues sans diminution de son affinité pour les nucléotides naturels. Les mutations les plus courantes de cette catégorie comprennent K65R, L74V, Q151M et M184V (Rai, Pannek, et Fichtenbaum 2018).

Le deuxième mécanisme implique les mutations appelées TAMs (thymidine analog mutations) sélectionnées par les analogues de la thymidine tels que la zidovudine (AZT) et la stavudine (d4T) : M41L, D67N, K70R, L210W, T215Y/F et K219Q/E. Leur présence sur le gène de la TI augmente la capacité de cette enzyme à exciser l'analogue nucléosi(ti)dique déjà incorporé à l'ADN proviral en cours d'élongation. L'analogue nucléosi(ti)dique détaché va être rattaché soit au pyrophosphate (PPi) soit à l'adénosine 5' triphosphate (ATP) afin d'éviter sa nouvelle incorporation à l'ADN (Rai, Pannek, et Fichtenbaum 2018).

Les inhibiteurs non nucléosidiques de la transcriptase inverse (INNTI)

Les INNTIs agissent par un mécanisme non compétitif en se fixant directement au niveau d'une poche hydrophobe à proximité du site catalytique de la TI. Ils bloquent ainsi les activités ADN-polymérase dépendantes de l'ARN et de l'ADN. Contrairement aux INTI, pour être actifs, ils ne nécessitent donc pas d'activation métabolique intracellulaire (phosphorylation) préalable (Garraffo 2008).

Les INNTIs commercialisés aujourd'hui en France sont : de première génération éfavirenz (EFV), névirapine (NVP) et de deuxième génération étravirine (ETR), rilpivirine (RPV) et doravirine (DOR).

Les INNTIs sont des molécules « à faible barrière génétique ». Une seule mutation confère une résistance élevée. La résistance aux INNTIs est due à trois mécanismes principaux :

- Inhibition par les mutations (par exemple, K103N et K101E) de la fixation des INNTIs à leur site d'action (poche hydrophobe de TI).
- Perturbation du contact entre les INNTIs et les résidus de leur domaine de liaison, les mutations les plus impliquées dans ce mécanisme sont Y181C et Y188L
- Le changement de la conformation ou de la taille de la poche hydrophobe, site de liaison des NNRTIs. Les mutations les plus impliquées dans ce mécanisme sont Y188L et G190E (Rai, Pannek, et Fichtenbaum 2018; Yoshida et al. 2020).

4.3 Les inhibiteurs de l'intégrase

Les inhibiteurs de l'IN (INSTIs pour « integrase strand transfer inhibitors ») inhibent le transfert de l'ADN double brin en se fixant au niveau du motif DDE du site catalytique de l'IN (cf. Figure 7) (Delelis et al. 2008). De plus, les INSTI chélatent les cations divalents nécessaires à l'activité de l'enzyme, Mg2+ ou Mn2+ (Delelis et al. 2008). L'inhibition de l'IN empêche alors l'intégration du génome du VIH dans le génome de la cellule hôte, ce qui bloque la production de nouvelles particules virales infectieuses (Jóźwik, Passos, et Lyumkis 2020).

Les molécules actuellement commercialisées ou utilisées dans le cadre d'essais cliniques sont les suivantes : raltegravir (RAL), elvitegravir (EVG), dolutegravir (DTG), cabotegravir (CAB) et bictegravir (BIC).

Le mécanisme principal de résistance du VIH-1 aux INSTIs implique la sélection de mutations au niveau du CCD, région très proche du site catalytique de l'IN (Rhee et al. 2019; Smith et al. 2021). Un nouveau mécanisme de résistance à EVG, RAL et DTG a été mis en évidence par Malet et *al*. impliquant des mutations de résistance en dehors du site catalytique de l'IN. Ces mutations sont situées principalement au niveau du 3'PPT (Malet et al. 2017).

Une récente étude suggère que la résistance aux INSTIs peut être liée au changement de conformation du site catalytique de l'IN suite à l'interaction de certaines mutations de résistance (N155H par exemple) avec le Mg2+ (Machado et Guimarães 2020).

4.4 Les inhibiteurs de la protéase

Les inhibiteurs de la protéase (IPs) agissent au cours de la dernière étape de la réplication virale et de la maturation des virions (*cf.* Figure 7). Les IPs sont des péptidomimétiques qui se lient compétitivement sur le site actif de la protéase. La protéase ne peut plus cliver les précurseurs et les nouveaux virus seront donc immatures et non infectieux. (J. Anderson et al. 2009).

Quatre IPs sont à l'heure actuelle couramment utilisés en thérapeutique humaine : lopinavir (LPV), tipranavir (TPV), atazanavir (ATV) et darunavir (DRV).

Un des premiers IP, le ritonavir (RTV), n'est plus utilisé comme un IP mais comme un potentialisateur (booster) grâce à son important effet inhibiteur du CYP3A.

Les IPs sont des molécules à barrière génétique élevée. Les principales mutations dites « majeures » sélectionnées par les IPs sont essentiellement présentes sur le site actif de la PR. Ce sont les D30N, G48V, I50L/V, V82A/F/L/S/T, I84V/A et L90M. Ces mutations de résistances induisent un changement de conformation de la PR, diminuant ainsi son affinité aux IPs ainsi qu'à son substrat naturel. Ce mécanisme provoque une diminution de la capacité réplicative du virus. Des mutations de résistances dites « mineures » ou « compensatrices » sont par la suite sélectionnées à distance du site actif de la liaison aux IPs pour augmenter l'activité de la PR et afin de remédier à cette diminution de la capacité réplicative du virus (Martinez-Cajas et Wainberg 2007).

4.5 Les autres antirétroviraux

De nombreuses nouvelles molécules appartenant à de nouvelles classes ARTs sont actuellement en essais cliniques (cf. Figure 7) dont: un INTI qui est également un inhibiteur de la translocation de la transcriptase inverse (Islatravir : EFdA), un anticorps monoclonal anti-CD4 (Ibalizumab) qui cible un domaine extracellulaire du récepteur CD4 humain, empêchant le changement de conformation de la protéine d'enveloppe gp120 et un inhibiteur de la capside (GS-6207 ou Lenacapavir) qui bloque l'assemblage de la capside conduisant à des virus non infectieux (Collins S. 2020).



Figure 7: Cibles Thérapeutiques des Antirétroviraux

bNAbs : « broadly neutralizing antibodies » ; IP : inhibiteurs de protéase ; INTI : inhibiteur nucléos(t)idique de la transcriptase inverse ; INNTI : inhibiteur non nucléosidique de la transcriptase inverse ; INSTI : inhibiteurs de l'activité de transfert de brin de l'intégrase.

5. HISTOIRE NATURELLE DE LA MALADIE

5.1 Primo-infection à VIH-1

La primo-infection (PHI) par le VIH correspond à la période des 12 premières semaines suivant la contamination, période pendant laquelle la réplication virale est importante avec un pic de virémie qui peut dépasser 10⁶ copies/ml (Soogoor et Daar 2005). Cette phase aigüe d'infection se caractérise par un risque élevé de transmission du VIH ainsi que la formation d'un réservoir important dans les cellules immunitaires (Cohen et al. 2011).

5.1.1 Réponse immunitaire au cours de la primo-infection

L'envahissement viral au cours de la PHI est caractérisé par une activation immunitaire intense et délétère des lymphocytes B, T et NK. Les mécanismes moléculaires, cellulaires et physiopathologiques de cette réponse immunitaire sont très complexes et encore mal compris (d'Ettorre et al. 2011).

Le premier reflet de cette activation immunitaire en PHI est une tempête cytokinique massive qui coïncide avec une vague de sécrétion de protéines inflammatoires. Stacey, R et ses collaborateurs ont étudiés la cinétique d'apparition des cytokines et des chimiokines (Interférons [INF], Interleukines : [IL]...) chez des donneurs de plasma nouvellement infectés par le VIH-1, et les virus des hépatites B (VHB) et C (VHC). La tempête cytokinique était plus rapide et plus importante chez les sujets infectés par le VIH-1 que chez ceux infectés par le VHB et le VHC (Stacey et al. 2009). La cinétique de croissance et de décroissance des cytokines suivait celle de la CVp (cf. Figure 8). L'augmentation de la virémie au cours de la phase aigue de la maladie s'est avérée concomitante à l'élévation rapide des taux plasmatiques d'INF- α et d'IL-15, Interferon gamma-induced protein 10 (IP-10), tumor necrosis factor- α (TNF- α) et de monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1). Des facteurs pro-inflammatoires supplémentaires tels que IL-6, IL-8, IL-18 et INF- γ augmentent plus lentement. L'augmentation de la cytokine immunorégulatrice IL-10 a été décrite comme la plus tardive (Stacey et al. 2009).



Figure 8: Cinétique de production des cytokines au cours de la primo-infection VIH-1

(Stacey et al. 2009)

Une récente étude évaluant la réponse cytokinique chez des femmes sud-africaines au cours de la phase aigüe de l'infection par un sous-type C du VIH-1, confirme la présence de cette tempête cytokinique intense largement décrite (Stacey et al. 2009; Roberts et al. 2010). Les auteurs se sont intéressés à certaines cytokines telles que IP-10, monokine induced by gamma interferon (MIG), INF- α , INF- γ , MCP-1, IL-12, récepteur soluble de l'IL-2, IL-1 receptor antagonist (IL-1RA), IL-8, B-cell activating factor (BAFF), C-X-C Motif Chemokine Ligand 13 (CXCL13) et soluble CD14 qui étaient particulièrement très élevées chez les sujets non traités rapidement (Muema et al. 2020).

La complexité du rôle des cytokines en PHI VIH est partiellement comprise et les bénéfices et actions de chacune sont très débattus (Roberts et al. 2010). L'IL-2 joue un rôle essentiel dans le développement et le maintien des cellules T régulatrices (TReg), qui sont essentielles dans la suppression de l'inflammation pendant l'infection. D'autres études ont montré sa capacité à induire la différenciation des cellules B, à promouvoir l'expansion des cellules NK et à améliorer les fonctions effectrices des cellules immunitaires.

IL-7 induit l'expression des protéines anti-apoptotique et contribue à la survie des LT et au maintien de la longévité des T CD8 + mémoires. Cependant un niveau élevé d'IL7 est associé

à une lymphopénie au cours de l'infection perturbant la différenciation des cellules T naïves et mémoires (Roberts et al. 2010).

L'IL-15 est essentielle pour le maintien et l'expansion des cellules T CD8 + mémoire et améliore le maintien et la survie des cellules NK. Un niveau élevé d'IL-15 peut accélérer la destruction des cellules effectrices mémoires, épuisant ainsi les cellules mémoires centrales (Roberts et al. 2010).

L'IL-21 favorise le maintien et la fonction des cellules Th17, essentielles pour la réduction globale de l'inflammation systémique.

L'INF active les cellules NK et régule certains FRC (APOBEC3G, TRIM5 α et MX2) qui ciblent différentes étapes du cycle de réplication du VIH. L'IFN peut aussi induire l'apoptose des cellules T CD4 + et atténuer l'effet des réponses des cellules T CD4 + et CD8 + spécifiques de l'antigène (Muema et al. 2020; Hoang et Paiardini 2019; Catalfamo, Le Saout, et Lane 2012).

L'IP-10 suscite beaucoup d'intérêt car son niveau en PHI est prédictif de la progression de la maladie. L'IP-10 est sécrétée par plusieurs cellules dont principalement les monocytes, les LT, les NK et les cellules endothéliales en réponse à l'INF- γ , INF- α , l'INF- β , IL-2, IL-17, IL-23, IL-27 et à certains lipopolysaccharides exogènes (Lei et al. 2019). Le taux plasmatique d'IP-10 est fortement corrélé à la numération des LT CD4 +, à la CVp et le niveau d'ADN du VIH. Il a été montré que le niveau d'IP-10 au cours des phases très précoces de l'infection est corrélé avec le temps nécessaire pour la déplétion du taux des LT CD4+ à 200 cellules / μ L (Lei et al. 2019; Ploquin et al. 2016).

La réponse immunitaire humorale est concomitante avec une réponse immunitaire cellulaire innée. Une réponse immunitaire adaptative et spécifique intervient plus tardivement car elle implique une cascade d'activation des cellules capables de reconnaitre spécifiquement les antigènes viraux.

Les acteurs de l'immunité innée sont activés dans les minutes et les heures suivant l'infection par le VIH-1 afin de réduire la transmission et la dissémination virale. Les principales cellules immunitaires impliquées sont les cellules dendritiques (CD), les monocytes, les macrophages, les LT et les NK. Les CD constituent une population hétérogène de cellules d'origine hématopoïétique. Ces cellules interviennent à différents niveaux dans le système immunitaire incluant l'initiation et la régulation des réponses immunes innée et adaptative. Les CD myéloïdes (mCD) stimulent la sécrétion et la régulation des cellules T CD4 + et CD8+. Les mCD sécrètent l'IL-12 jouant un rôle important dans l'activation des NK. Les CD plasmacytoïdes (pCD) sont les principales cellules sécrétrices de l'INF type I. La réduction du nombre des pCD reflète leur marginalisation vers les tissus lymphoïdes où ils se concentrent surtout durant la PHI et qui y sont sujettes à un phénomène d'apoptose intense. Le nombre de pDC circulants a été positivement corrélé à la numération des LT CD4 + et négativement corrélé avec la CVp et la progression de la maladie (Miller et Bhardwaj 2013; Smed-Sörensen et Loré 2011). Le rôle des cellules présentatrices d'antigène (cpAg) des CD aux lymphocytes après liaison aux virus par la Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing-Nonintegrin (DC-sign), est primordial dans l'établissement de la réponse adaptative contre l'infection à VIH-1 (Zhou et al. 2006).

Les macrophages peuvent exprimer à leur surface des récepteurs CD4 et CCR5, les rendant ainsi cibles du VIH-1. Les macrophages peuvent s'infecter suite à la phagocytose du virus. Ces cellules immunitaires diminuent de façon importante au cours de la PHI et participent par la suite à la dissémination du virus dans l'organisme et à l'établissement, en plus des cellules T CD4+ quiescentes, de réservoirs viraux persistants au niveau de différents tissus (Merino et al. 2017). Une étude récente a démontré que les LT infectés sont capables de transférer très efficacement le VIH-1 vers des macrophages cibles par des mécanismes de fusion cellulaire. Les LT établissent un contact intercellulaire étroit avec les macrophages permettant ainsi la fusion des deux types cellulaires et le transfert du matériel viral aboutissant à la formation de cellules hybrides exprimant à la fois des marqueurs cellulaires de lymphocytes T et de macrophages et permettant la production d'un grand nombre de virons (Bracq et al. 2017).

Parallèlement, les cellules NK sont activées. Ces cellules jouent un rôle important dans le contrôle initial de la réplication virale dès la PHI. Les NK contribuent à la réduction de la réplication virale par cytolyse des cellules infectées. Elles peuvent également par production des cytokines et chimiokines (exemple : MIP1a et MIP1b), ligands naturels du CCR5, bloquer l'entrée du virus dans les LT CD4 (J et al. 2017).

L'immunité spécifique anti-VIH intervient plus tardivement car elle implique une cascade d'activation des cellules capables de reconnaitre spécifiquement les antigènes viraux.

La réponse LT CD8 anti VIH a été largement étudiée durant les stades très précoces de l'infection. Les LT CD8 contrôlent directement la virémie en reconnaissant les épitopes présents au début de l'infection (Env, Nef, Gag p24 Pol). Cette action se traduit par l'élimination des LT CD4 infectées. Ces cellules immunitaires sont aussi productrices de chimiokines, de perforines et de granzymes à actions suppressives des cellules infectées. Cependant, un nombre élevé de mutations du VIH lui permet d'échapper à la reconnaissance antigénique des LT CD8 +. Le virus est responsable par la suite de la diminution du pool circulant de ces cellules effectrices et mémoires suite à la perturbation des fonctions des LT CD4+ et cpAgs nécessaires à leur maturation (Collins, Gaiha, et Walker 2020; Gulzar et Copeland 2004).

Les LT CD4 sont les principales cibles du VIH-1 (Dalgleish et al. 1984). Au cours de la PHI, ces cellules sont très altérées et atteignent rapidement un niveau très bas ($<500/\text{mm}^3$). Les LT CD4 activés produisent des cytokines antivirales dont principalement l'INF. La tempête cytokinique bien que bénéfique au début pour lutter contre la dissémination virale contribue à la prolifération anarchique des LT CD4 empêchant une compensation efficace par les cellules mémoires en raison de leur déplétion importante (Sanchez-Martinez et al. 2019; Kaufmann, Bailey, et al. 2004; Fenwick et al. 2019). La perte progressive des fonctions des LT se traduit par la perte de leur capacité proliférative, leur potentiel cytotoxique ainsi que la perte de la production des cytokines pro-inflammatoires dont principalement IL-2 et INF- γ (Fenwick et al. 2019).

La surproduction des cytokines durant la PHI impacte aussi l'activation du répertoire des lymphocytes B (LB). Les anomalies de cette lignée lymphocytaire se traduisent par une hypergammaglobulinémie associée à une activation polyclonale anti-VIH et un défaut de différenciation et de maturation des LB (Moir et Fauci 2017). La première réponse immunitaire humorale se traduit par la détection de complexes immuns, 8 jours après la détection du virus dans le plasma. Les anticorps anti-gp41 apparaissent au 13^{ème} jour suivis par l'apparition des anticorps anti-gp120 au 14^{ème} jour.

Des modèles mathématiques de la dynamique virale précoce ont été développé afin d'étudier l'impact de cette réponse humorale in vivo sur la réplication et la dissémination virale. Les résultats ont montré que ces premiers anticorps ne sont pas neutralisants, ils sont capables de se fixer sur les virions mais n'ont aucun impact sur le contrôle de l'infection. (Tomaras et al. 2008). Plus tardivement, à 12 semaines apparait la réponse anticorps neutralisants qui ciblera uniquement les protéines d'enveloppe du virus transmis, expliquant son inefficacité sur les mutants émergents (Wei et al. 2003).

5.1.2 Aspects cliniques

La proportion de patients ayant des symptômes et/ou des signes cliniques observés au moment du diagnostic de PIH est évalué à 50% (Morlat. 2016). Les signes cliniques sont les conséquences de l'activation et de l'inflammation majeure au cours de cette phase aigüe de la maladie. Ils apparaissent 10 à 15 jours suivant la contamination et peuvent durer jusqu'à 10 semaines.

La PIH associe de façon variable des signes cliniques : syndrome viral aigu (fièvre, céphalées, malaise, tachycardie, arthralgies et myalgies, asthénie); polyadénopathie, manifestations cutanéo-muqueuses (angine ou pharyngite, rash, ulcères oraux ou génitaux); troubles digestifs (diarrhée); symptômes neurologiques (troubles cognitifs, déficit moteur, neuropathie, méningite lymphocytaire, encéphalite...) avec des anomalies biologiques : hématologiques (thrombopénie, neutropénie, hyperlymphocytose dans le cadre d'un syndrome mononucléosique ou lymphopénie précoce) et cytolyse hépatique (Morlat. 2016).

La sévérité, le nombre et la durée des symptômes durant la PHI sont corrélés avec la progression de la maladie (Vanhems et al. 2000; Mellors et al. 1996; Henrard et al. 1995) surtout dans le cas de la PHI associée avec des signes neurologiques (Boufassa et al. 1995).

Malheureusement, la brièveté de la phase symptomatique et la non-spécificité des symptômes sont en partie responsables du dépistage insuffisant de l'infection par le VIH en phase de PHI, constituant ainsi un problème majeur de santé publique (Prins et al. 2017).

La fréquence du diagnostic de l'infection à VIH-1 au moment d'une PHI a baissé en France ces dernières années. Le nombre de patients diagnostiqués en PHI est estimé aux alentours de 6,5% parmi le nombre total de découverte d'infection à VIH-1 contre 11% en 2014 (Benoit Visseaux et al. 2020; Morlat. 2016). Le retard de diagnostic de la maladie à cette phase
conduit au retard d'initiation du traitement ART et contribue à la poursuite de l'épidémie favorisant l'apparition de clusters de transmissions (Cohen et al. 2011; Benoit Visseaux et al. 2020).

5.1.3 Les stades de la primo-infection à VIH

La PHI peut être subdivisée en différents stades dits de \ll Fiebig \gg selon la cinétique d'apparition des divers biomarqueurs dans le sang (ARN-VIH, Antigène p24 et anticorps anti-VIH-1) (cf. Figure 9) (Fiebig et al. 2003). Les délais d'apparition des différents marqueurs sont des données indicatives moyennes. Ces délais varient selon les performances des techniques utilisées et selon la réponse immunitaire du sujet infecté.

Juste après l'exposition, il y a une phase d'éclipse qui dure environ 10 jours durant laquelle aucun signe clinique ou biologique n'est détectable.

La CVp commence à augmenter à partir du $10^{\text{ème}}$ jour ce qui correspond au stade Fiebig I. La détection de l'ARN VIH dans le sang constitue alors le premier marqueur de diagnostic précoce de la PHI. L'antigène p24 (AgP24) commence à se positiver au $15^{\text{ème}}$ jour sans phase de séroconversion ce qui correspond au stade Fiebieg II. Au stade Fiebig III, les IgM anti-VIH commencent à apparaître et peuvent être détectés par les tests Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). Les IgG anti-VIH ne sont détectés que durant le stade Fiebig IV correspondant à peu près au $25^{\text{ème}}$ jour de l'infection. La présence de certaines bandes peut être détectée sur le Western-blot (WB) sans pouvoir confirmer l'infection par le VIH. Au stade Fiebig V, le WB devient positif (à partir du $30^{\text{ème}}$ jour de la contamination) sans la bande p31/34. Le WB devient complet au stade VI correspondant à 3 mois suivant la contamination (cf. Figure 9) (Fiebig et al. 2003; Cohen et al. 2011).



Figure 9: Stades de la primo-infection VIH-1 selon la classification de Fiebig

Adapté de (Cohen et al. 2011)

5.2 STADE CHRONIQUE

La deuxième phase de la maladie est l'infection chronique. L'infection évolue de façon asymptomatique. Le virus continue à se multiplier dans tout l'organisme avec une CVp, appelée « set-point » virologique, plus faible mais corrélée avec celle en PHI (Sabin et Lundgren 2013). C'est une étape de stabilité clinique avec un équilibre apparent entre la réplication virale et les défenses immunitaires. En l'absence de traitement, cette phase peut durer jusqu'à 10 ans. La déplétion des cellules immunitaires continue discrètement et le taux de LT CD4+ sanguin devient inférieur à 200 cellules/mm³ car la capacité de l'organisme à produire ces cellules ne peut pas compenser les pertes sur le long terme (Okoye et Picker 2013; Février, Dorgham, et Rebollo 2011). L'activation immunitaire chronique et progressive conduit au stade SIDA caractérisé par un large éventail d'infections opportunistes telles que la pneumocystose, la toxoplasmose cérébrale, le sarcome de Kaposi ou certains lymphomes ainsi que des dommages au niveau de nombreux tissus (intestins, poumons...) et des maladies chroniques cardiovasculaires, hépatiques, pulmonaires et du système nerveux central (Lucas et Nelson 2015).

6. Les réservoirs du VIH

Le réservoir du VIH-1 a été défini par les cellules et les tissus infectés impliqués dans la maintenance à long terme du virus dans l'organisme. Ces cellules et tissus contenant du génome viral inductible sont capables de produire du virus infectieux avec une cinétique de renouvellement plus lente (Blankson, Persaud, et Siliciano 2002). Une définition plus large inclut également les génomes viraux n'aboutissant pas à cette synthèse de nouveaux virons mais pouvant néanmoins être en partie transcrits, voire traduits en protéines (Avettand-Fènoël et al. 2016).

L'intégration de l'ADN VIH dans la cellule de l'hôte conduit à la formation du provirus, forme stable du réservoir viral. Les autres formes virales de latence sont variables d'une cellule à une autre. Il s'agit des formes linéaires d'ADN VIH, qui sont des formes préintégratives labiles et des formes épisomales circulaires à 1 ou 2 LTR qui résultent probablement d'échec d'intégration. (*cf.* Figure10) (Rouzioux et Avettand-Fénoël 2009).



Figure 10: Les réservoirs du VIH-1

Les formes virales de latence sont : ADN VIH intégré dans le chromosome cellulaire (provirus), ADN VIH linéaire non intégré et formes épisomales circulaires à 1 ou 2 LTR. Les lymphocytes T CD4+ sont les principales cellules cible du VIH (cellules infectées en phase de production (A) ou cellules infectées latentes (B). Les cellules dendritiques, les monocytes et les macrophages peuvent être cibles du VIH. Elles participent également à la transmission et la diffusion de l'infection vers les différents tissus infectés. Les tissus riches en cellules lymphocytaires (ganglions lymphatiques, tissu digestif, compartiments génitaux, système nerveux central...) contiennent une très grande partie du réservoir viral (Rouzioux et Avettand-Fénoël 2009).

L'ADN viral intégré est la forme la plus stable du réservoir viral. Son intégration dans le génome de l'hôte constitue un facteur majeur de la latence et de la persistance du VIH-1. Le provirus est transmis à toutes les cellules filles lors des divisons cellulaires. Des études de séquençage à haut débit ont déterminé la proportion du provirus intact capable de se réactiver et induire la formation de nouveaux virions. Seuls 5 à 12% des génomes étudiés sont trouvés intacts et compétents pour la réplication virale (Ho et al. 2013; Bruner et al. 2016; Hiener et al. 2017).

La proportion du provirus intact est variable selon les patients et les différentes populations lymphocytaires. Hiener et ses collaborateurs ont montré que seulement 5% de l'ADN VIH

intégré est intact. Cette proportion varie de 1,3% à 10,3% en fonction des patients. 3% de provirus intact ont été retrouvés chez 3 patients traités durant la phase chronique de la maladie contre 6% chez 3 patients traités durant la PHI (Hiener et al. 2017). Ces résultats sont concordants avec ceux de Bruner et *al.* Les patients traités durant la phase chronique de l'infection avaient 2% de provirus intact contre 7% chez les patients traités précocement durant la PHI (Bruner et al. 2016).

95% des génomes étudiés par Hiener et *al.* sont défectifs à cause des erreurs de la TI et de l'action des FRC (*cf.* Figure 11). Les défauts génétiques décrits sont des larges délétions, des mutations ponctuelles sur des sites de régulation indispensables à l'expression correcte du génome viral (site majeur d'épissage et site d'encapsidation), des hypermutations G vers A et des codons stop induits par APOBEC3, des inversions internes et des mutations ponctuelles décalant le cadre de lecture (Hiener et al. 2017).



Figure 11: Proportions des différents défauts génétiques au niveau du provirus VIH-1

Détermination de la proportion du provirus intact dans 531 séquences chez 6 patients sous traitement antirétroviral (3 patients traités en primo-infection VIH et 3 autres traités durant la phase chronique de l'infection). La proportion du provirus intact est estimée à 5%. Elle varie de 1,3% à 10,3% selon les patients (6% chez les patients traités précocement et 3% chez ceux traités tardivement). 95% des séquences sont considérées défectives avec 5% d'inversions internes, 68% d'une large délétion, 9% d'hypermutations des codons stop, 1% de décalage du cadre de lecture et 11% de défaut dans le site d'encapsidation ou le site majeur d'épissage (Hiener et al. 2017).

Les formes non intégrées de l'ADN VIH : l'ADN VIH linéaire et les formes épisomales à 1 ou 2 LTR étaient considérées comme des formes labiles et instables conduisant à un échec d'infection de nouvelles cellules. Des preuves récentes ont montré que ces formes du réservoir peuvent être transcriptionellement actives et peuvent conduire à la production d'ARN viral et des protéines dans plusieurs types de cellules, y compris les LT CD4 quiescents (Y. Wu 2004; Sloan et Wainberg 2011; Brussel et Sonigo 2004; Sloan et al. 2010; Chan et al. 2016; Meltzer et al. 2018).

Les cercles à 2 LTR , ne sont considérés que depuis peu comme marqueurs de réplication virale (Sharkey et al. 2005). Une récente étude d'intégration in vitro et in vivo, a montré que

ces formes épisomales peuvent constituer une réserve potentielle de génomes pour une intégration de novo. L'intégrase du VIH peut efficacement les utiliser comme substrat pour les intégrer dans le génome cellulaire (Richetta et al. 2019). Ces résultats sont concordants avec les travaux de Thierry et ses collaborateurs qui ont rapporté après l'élimination du RAL des cultures cellulaires, la diminution des cercles 2 LTR et l'augmentation transitoire de l'ADN linéaire, intégré ensuite dans le génome de la cellule et conduisant à de nouveaux cycles de réplication (Thierry et al. 2015).

6.1 Etablissement du réservoir viral

Le VIH infecte de nombreuses cellules myéloïdes (monocytes, macrophages, CD...) et lymphoïdes (LT, LB et NK) conférant suivant leur lieu de résidence et leur capacité de migration, des niveaux de réservoirs variables entre les différents compartiments tissulaires et cellulaires.

6.1.1 Le réservoir cellulaire

6.1.1.1 Les lymphocytes CD4+

Les LT CD4+ constituent la cible principale du virus VIH-1, ils expriment la protéine CD4 et les co-récepteurs CCR5 et CXCR4. La destruction de ces cellules au cours de l'infection VIH est due principalement à l'effet cytopathique du virus et/ou à la réponse cytotoxique de l'hôte (Costin 2007; Okoye et Picker 2013). Les LT CD4+ peuvent être subdivisés en sous-populations lymphocytaires en fonction de leur état de différenciation (état de mémoire et de fonctions effectrices). On distingue les lymphocytes naïfs (TN), les cellules souches mémoires T (TSCM, stem cell memory T-cell), les lymphocytes mémoires centraux (TCM, central memory T-cell), les lymphocytes mémoires (TEM, effector memory T-cell) (cf. Figure 12).

Ces différentes sous-populations lymphocytaires ont une durée de vie, des capacités d'activation et de prolifération différentes (Kulpa et Chomont 2015).

L'activité de ces cellules augmente avec l'état de différenciation, tandis que leur durée de vie et leur capacité proliférative diminuent (Farber, Yudanin, et Restifo 2014; Kulpa et Chomont 2015).



Figure 12: Différentes sous-populations lymphocytaires CD4+ et leur contribution à la formation du réservoir du VIH

On distingue les lymphocytes naïfs, les cellules souches mémoires T (stem cell memory T-cell), les lymphocytes mémoires centraux (central memory T-cell), les lymphocytes mémoires transitionnels (transitional memory T-cell) et les lymphocytes mémoires effecteurs (effector memory T-cell). Les sous-populations CD4+ peuvent être classées selon leur état de différenciation et de mémoire. Des marqueurs spécifiques de surface cellulaire peuvent être utilisés pour identifier chaque sous-population lymphocytaire (Kulpa et Chomont 2015).

La quantification de l'ADN VIH a montré une contribution différente au maintien du réservoir viral au sein des sous-groupes lymphocytaires. Les TN peuvent intégrer l'ADN VIH mais leur fréquence d'infection est généralement bien inférieure à celles des cellules mémoires. Les TCM, les TTM et les TEM ont été décrits comme étant les principaux réservoirs du VIH (Ostrowski et al. 1999; Josefsson et al. 2013; Chomont et al. 2009; Brenchley et al. 2004; Hiener et al. 2017). D'autres études se sont intéressées aux TSCMs et ont montré que ces cellules ne représentent que 2% des LT CD4+ circulants mais abritent des niveaux élevés d'ADN VIH (Buzon, Sun, et al. 2014; Jaafoura et al. 2014; Chahroudi, Silvestri, et Lichterfeld 2015).

Cette différence de contribution au réservoir viral des différentes cellules peut être expliquée par le type de co-récepteurs utilisé lors de l'entrée du virus dans la cellule hôte. La majorité des souches transmises ont un tropisme R5, par contre les souches à tropisme X4 peuvent apparaître plus tardivement au cours de l'infection. Seuls 2 % des TN expriment le

corécepteur CCR5 alors qu'il est exprimé dans 75% des cellules mémoires (Cashin et al. 2014; Council et Joseph 2018).

Une autre classification fonctionnelle des LT CD4+ peut être faite en se basant sur leur facteur de transcription, leur expression de récepteurs et leur fonction de sécrétions de cytokine (Février, Dorgham, et Rebollo 2011) : les T helper (Th) : Th1, Th2, Th9, Th17, Th22, T follicular helper (Tfh) et T régulateurs (Treg) (cf. Figure 13).



Figure 13: Classification fonctionnelle des lymphocytes T CD4+

Voies de différenciation des lymphocytes CD4 + suite à l'activation par un antigène donné. Le type de cellule effectrice varie en fonction des cytokines sécrétées au cours de l'infection : les Th1, Th2, Th9, Th17, Th22, T follicular helper (Tfh) et T régulateurs (Treg). Toutes ces cellules sont définies en fonction de l'expression des facteurs de transcription et des cytokines effectrices (Février, Dorgham, et Rebollo 2011). Les Th1, principaux sécréteurs d'INF-γ, stimulent l'activité cytotoxique des LT CD8+ et des NK ainsi que la cytotoxicité dépendante des anticorps (ADCC).

Les Th2, cellules sécrétrices d'IL4 et d'IL13, contribuent à l'activation des réponses immunitaires humorales.

Les Th17 sont très impliqués dans l'homéostasie intestinale et sont caractérisés par la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (IL-17, IL-1, IL-6, IL21, IL-22 and TNF) surtout durant la PHI.

Les Treg expriment les co-récepteurs CCR5 et CXCR4 et sont très susceptibles à l'infection par le VIH. Ils contribuent au contrôle des réponses immunitaires principalement au niveau du thymus en jouant un rôle majeur dans la suppression de l'activation cellulaire ainsi que le maintien de la tolérance immune.

Les Tfh stimulent la différenciation et la maturation des LB principales cellules de la réponse immunitaire humorale (Février, Dorgham, et Rebollo 2011; Zhu 2018).

L'analyse par NGS du génome viral présent dans ces différents sous-types cellulaires a montré que la proportion de génomes intacts est la plus élevée dans les cellules polarisées Th1, suivies des Th17, puis des Th2 et Th9 (Lee et al. 2017). Treg et Tfh ont été aussi décrites comme cellules préférentielles d'infection par le VIH grâce à leur expression du co-récepteurs CCR6 qui présente une grande permissivité pour ce virus facilitant ainsi sa dissémination dans le tissu intestinal (Monteiro et al. 2011).

6.1.1.2 Monocytes/Macrophages

Les monocytes et les macrophages expriment à leur surface les molécules CD4 et CCR5/CXCR4 ce qui leur rend susceptible à l'infection par le VIH-1. L'intégration du génome viral dans les macrophages commence dès les premiers jours de l'infection (Freed, Englund, et Martin 1995). La présence de l'ADN VIH a été détectée dans les monocytes circulants et dans les macrophages alvéolaires au cours de la phase chronique de l'infection (Jambo et al. 2014).

Ces cellules ne sont pas très sensibles à l'effet cytopathique du VIH (Swingler et al. 2007). La réplication virale y est plus lente que dans les LT. Ceci a été expliqué par la forte expression

dans ces cellules myéloïdes du FRC SAMHD qui réduit le pool intracellulaire en dNTP indispensable pour la synthèse des acides nucléiques du virus (Koppensteiner, Brack-Werner, et Schindler 2012; D Urbano, De Crignis, et Re 2018; Jia, Zhao, et Xiong 2015). En revanche, l'infection des macrophages conduit à la dissémination plus rapide du virus dans l'organisme suite à la présentation antigénique du virus aux LT CD4+ et l'infection de plusieurs tissus de l'organisme même au niveau du système nerveux central (SNC) dont l'infiltration par des cellules gliales infectées a été décrite dès le 8^{ème} jour de l'infection (Valcour et al. 2012). Toutes ces données ainsi que la demi-vie longue de ces cellules et leur capacité migratrice suggèrent leur contribution au maintien du réservoir viral au cours de l'infection à VIH (M. E. Wong, Jaworowski, et Hearps 2019).

6.1.1.3 Les cellules dendritiques

Les CD sont les principales cpAgs de l'organisme. Ce sont des composants essentiels du système de défense de l'hôte contre le VIH, jouant un rôle central dans la liaison entre l'immunité innée et celle adaptative (Smed-Sörensen et Loré 2011). Ces cellules expriment peu les récepteurs électifs du virus à savoir CD4, CXCR4 et CCR5 ; en revanche, elles ont une capacité très élevée à capter les particules virales à leur surface par la lectine DC-sign (da Silva, Segat, et Crovella 2011). Les CD ont aussi une capacité migratoire importante permettant de disséminer le virus dans les organes lymphoïdes (Abrahem et al. 2020). L'altération des fonctions de ces cpAgs au cours de l'infection VIH conduit à la perturbation et la diminution de la libération des cytokines. Cette inhibition serait responsable de la diminution de l'activité des Th1, Th2, Th17 et Treg (Abrahem et al. 2020).

La fonction clef des CD dans l'établissement de la réponse immunitaire contre le VIH et leur capacité de migration et de dissémination du virus confirment leur potentiel d'assurer la persistance et la latence de l'infection par le VIH.

6.1.2 Le réservoir tissulaire

Le VIH infecte principalement les LT CD4 +. 2% seulement de ces cellules se trouvent dans la circulation sanguine, la majorité de ces cibles virales résident dans le tractus gastro-

intestinal (GI), les ganglions lymphatiques (LN) et d'autres tissus lymphatiques (Ganusov et De Boer 2007).

La plupart des études sur le réservoir viral ont été conduites dans le sang périphérique. En revanche, le réservoir tissulaire constitue la source principale de la latence de l'infection par le VIH. La contribution des tissus au maintien du réservoir est hétérogène et l'évolution du virus peut varier d'un site à un autre par le phénomène de compartimentation.

6.1.2.1 Organes lymphoïdes secondaires

Les organes lymphoïdes secondaires sont les ganglions lymphatiques (LN), la rate et les tissus lymphoïdes associés aux muqueuses (MALT) dont principalement le GALT (Gut-associated lymphoid tissue) et le BALT (bronchus-associated lymphoid tissue).

Ces organes lymphoïdes sont très riches en LT CD4+. Ils constituent un site majeur de réplication virale et contiennent un nombre très élevé de virions libres transportés par les CD folliculaires (Pantaleo et al. 1993; Embretson et al. 1993).

Les LN jouent un rôle central dans la pathogenèse et le développement de l'immunité adaptative suite à la génération de réponses de LB spécifiques à l'antigène dans des domaines spécialisés appelés centres germinatifs (CG). Les Tfh résidents dans ces CG jouent un rôle primordial dans le maintien du réservoir dans ces organes grâce à leur capacité à infecter de nouvelles cellules T CD4 dans les LN (J. K. Wong et Yukl 2016; Banga et al. 2019). Durant les premiers jours de l'infection, le VIH se propage rapidement dans les LN en raison du trafic important des LT CD4+ entre le sang périphérique et les vaisseaux lymphatiques. La dissémination systémique du virus se produit dans les 6 à 25 jours (Cohen et al. 2011). Plusieurs études portant sur l'établissement du réservoir viral au niveau des LN suggèrent que ce réservoir peut être établi dans les 2 premières semaines de l'infection (Kline et al. 2013; Bourry et al. 2010). Kline et al. ont infecté 12 macaques par une souche virale sensible à tous les INNTIs. La mesure longitudinale de l'ARN et de l'ADN viral a été faite dans le sang périphérique et dans différents tissus lymphoïdes par une technique de polymerase chain reaction (PCR) quantitative. La CV-ADN était variable selon la localisation de la biopsie avec un taux très élevé principalement au niveau des LN, de la rate et du GALT, contrairement au niveau de la moelle osseuse et du tissu cérébral. Ce travail a montré la forte corrélation entre les concentrations d'ADN viral dans le tissu lymphoïde des macaques et la CVp une semaine après l'infection. Kline et ses collaborateurs suggèrent alors que l'établissement du réservoir au niveau de ces tissus se produit très tôt durant l'infection et serait corrélé avec le niveau de la CVp au moment de la PHI (Kline et al. 2013).

La rate, organe lymphoïde assurant le lien entre le système immunitaire et circulatoire, a été décrite comme important tissu réservoir du VIH. Elle joue un rôle clé dans la persistance virale de par sa grande richesse en cellules lymphoïdes. Le séquençage du génome viral dans différents tissus lymphoïdes chez 5 patients a montré que le tissu splénique est très riche en ADN proviral suggérant son rôle de site sanctuaire pour le VIH (Nolan et al. 2018).

Le GALT est considéré comme un réservoir majeur du VIH. Ces tissus contiennent le plus grand nombre de cellules infectées car ils abritent plus de 90% des lymphocytes de tout l'organisme (J. K. Wong et Yukl 2016). Rapidement après la contamination, le VIH traverse la couche épithéliale et a accès à une population dense de LT CD4 de la lamina propria. La lamina propria abrite un pool diversifié de populations lymphocytaires Th1, Th2, Th17 et Th22 et Trég dont le rôle dans la réponse immunitaire et dissémination virale a été déjà montré (Khan et al. 2017). Plusieurs études ont rapporté la détection de l'ARN et de l'ADN du VIH au niveau de ces tissus même chez des patients en suppression virologique (Lafeuillade et al. 2009; Belmonte et al. 2007; Yukl et al. 2013). L'ADN VIH et l'AgP24 ont été également détectés dans des macrophages duodénaux (Zalar et al. 2010). Yukl et *al.* ont comparé les taux de l'ADN-VIH et de l'ARN-VIH non épissé dans 4 régions du tractus gastro-intestinal (duodénum, iléum, colon ascendant et le rectum) chez 8 patients traités avec une CVp<40 copies/ml. Les taux d'ADN et d'ARN étaient 12 fois plus élevés dans les 4 sites intestinaux que dans le sang (Yukl et al. 2010).

Toutes ces données suggèrent la place importante que confère le GALT dans le maintien du réservoir et de la persistance virale.

6.1.2.2 Organes lymphoïdes primaires

Les organes lymphoïdes primaires sont le thymus et la moelle osseuse. Le VIH peut infecter plusieurs types de cellules au niveau de la moelle osseuse. L'ADN viral a été détecté plusieurs fois au niveau des cellules progénitrices hématopoïétiques et des mastocytes. La détection de l'ADN-VIH au niveau du thymus est très variable et fugace. (J. K. Wong et Yukl 2016).

Ces organes lymphoïdes constituent une cible potentielle du VIH mais leur contribution dans le réservoir viral est moins importante que celle des organes lymphoïdes secondaires.

6.1.2.3 Autres réservoirs tissulaires

Tous les organes et les compartiments de l'organisme hébergeant des LT CD4 ou d'autres cellules cibles du VIH peuvent constituer un réservoir potentiel de ce virus.

Plusieurs études chez des patients traités ou non ont montré l'infection des cellules de Kupffer hépatiques. L'ADN et l'ARN du VIH ont été aussi détectés dans les cellules pulmonaires ainsi que dans les LT CD8 + pulmonaires et les macrophages obtenus par lavage bronchoalvéolaire (J. K. Wong et Yukl 2016).

L'infection des organes du tractus génital a été mise en évidence dès la PHI et persiste durant le phase chronique de l'infection. Le VIH dans le sperme est retrouvé sous la forme de particules virales libres ou intégrées dans les lymphocytes infectés. L'ARN-VIH peut être détecté dans le sperme chez 2 à 48% des hommes avirémiques (Marcelin et al. 2008; Sheth et al. 2009; Lambert-Niclot et al. 2012). Peu d'études ont été faites chez les femmes mais l'ADN et l'ARN viral ont été retrouvé dans le secrétions cervico-vaginales et les organes génitaux féminins (P. Gupta et al. 2002; Coombs, Reichelderfer, et Landay 2003).

Malgré le taux trè faible de LT au niveau SNC, ce dernier peut être également considérés comme un réservoir du VIH du fait de la présence de plusieurs cellules exprimant le CCR5 et la molécule CD4 dont principalement les astrocytes, les macrophages périvasculaires et les cellules gliales activées (J. K. Wong et Yukl 2016).

6.2 Analyse quantitative du réservoir viral

La quantification des différentes formes de l'ADN VIH permet d'estimer la fréquence des cellules infectées. Dans la pratique clinique, il existe un besoin pressant d'identifier les biomarqueurs optimaux pour mesurer la taille et la dynamique du réservoir d'ADN du VIH aux différents stades de l'infection dans le but d'une prise en charge optimale des patients, d'évaluer les impacts des stratégies d'intervention sur la taille du réservoir ainsi qu'au développement de nouvelles stratégies d'éradication de l'infection.

Les nombreuses études du réservoir sont très hétérogènes en fonction des sous-population des cellules infectées étudiées, de la technique utilisée et de la localisation des prélèvements.

En raison de la difficulté d'obtention des biopsies des différents tissus de l'organisme et étant donné que le sang est le reflet des échanges cellulaires continus avec les différents tissus infectés la majorité des études ont été faites au niveau du sang périphérique (cellules mononuclées du sang périphérique (PBMC), sous-populations lymphocytaires caractérisées par tri cellulaire ou sang total) (Rouzioux et Avettand-Fénoël 2009).

Les différentes formes de l'ADN-VIH à quantifier sont les formes intégrées : provirus, et celles non intégrées : ADN VIH linéaire et les formes épisomales à 1 ou 2 LTR. Les différentes techniques existantes ne détectent pas toutes les mêmes formes du virus (*cf.* Figure 14).



Figure 14: Les différentes formes d'ADN VIH et les méthodes permettant de les détecter ou de quantifier leurs produits

(Trémeaux, Rouzioux, et Avettand-Fènoël 2019).

6.2.1 ADN VIH total

La quantification de l'ADN VIH total permet d'estimer le nombre total des cellules infectées contenant les différentes formes intégrées ou non du réservoir (cf. Figure 14).

La technique la plus simple et la plus utilisée est la **PCR quantitative** (qPCR). Cette technique peut être réalisée à partir d'un très faible volume de sang, d'autres liquides biologiques ou des prélèvements de biopsies. Elle est sensible, spécifique et reproductible (Avettand-Fènoël et al. 2016).

En France, une technique de qPCR en temps réel ciblant la région génomique du LTR a été développée dans le cadre du groupe de travail de la quantification virale de l'Agence Nationale de Recherches sur le Sida et les hépatites virales-Maladies Infectieuses Emergentes (ANRS-MIE). Actuellement elle est largement utilisée en routine clinique pour le dépistage des nouveau-nés de mères séropositives (Avettand-Fènoël et al. 2009) ou dans le cadre de plusieurs essais thérapeutiques et cohortes de patients (Avettand-Fènoël et al. 2016).

L'ADN VIH total peut être quantifié par une nouvelle technologie de PCR qui est la PCR digitale en gouttelettes (**Droplet Digital PCR**, [**ddPCR**]). La ddPCR permet une quantification ultrasensible et absolue des acides nucléiques. Son principe se base sur la dilution très poussée de l'extrait d'ADN et sa répartition dans plusieurs milliers de gouttelettes (environ 20000 gouttelettes). La PCR se fait indépendamment dans chaque gouttelette et la détection finale est basée sur la fluorescence. Les résultats s'analysent en comptant le nombre de gouttelettes positives par rapport à leur nombre total et permet ensuite de calculer un nombre de copie/ μ L d'ADN détecté (Perez-Toralla et al. 2015). En plus de sa haute précision et reproductibilité, cette technique n'a pas besoin de standards de quantification comme la qPCR. En revanche certaines études rapportent de faux positifs dont l'origine n'est pas encore claire (E. M. Anderson et Maldarelli 2018).

La principale limite de toutes ces techniques de quantification de l'ADN VIH total est leur incapacité de distinguer les virus compétents des virus défectifs.

6.2.2 ADN VIH intégré

La quantification spécifique de l'ADN VIH intégré est possible grâce à la PCR-Alu. Cette méthode est basée sur l'amplification de la région entre le provirus et les motifs Alu. Les motifs Alu sont des petites séquences d'ADN, les plus répétitives du génome humain (Cardelli 2011).

La PCR-Alu-LTR repose sur une amplification en deux étapes (c*f.* Figure 15). Une première PCR amplifie la séquence entre le LTR viral et le motif Alu le plus proche. Un deuxième cycle de PCR nichée en temps réel amplifie spécifiquement la région du LTR (Brussel, Delelis, et Sonigo 2005).



Figure 15: Méthode de quantification de l'ADN VIH intégré par la technique de PCR Alu-LTR (Brussel, Delelis, et Sonigo 2005)

Une limite majeure de cette technique est la distance variable entre le site d'intégration du VIH et les séquences Alu. Les premiers tests ont utilisé des standards ADN préparés à partir de lignées cellulaires infectées dans lesquelles les provirus sont intégrés à des endroits spécifiques,

à une distance fixe des motifs Alu, contrairement à l'intégration aléatoire du provirus in vivo. Brussel et *al.* ont essayé d'augmenter la sensibilité de cette technique notamment avec l'utilisation des lignées cellulaires dans lesquelles le provirus est intégré à des endroits différents (Brussel, Delelis, et Sonigo 2005).

Une autre technique de quantification de l'ADN VIH total a été récemment décrite. C'est une technique qui couple la séparation de l'ADN selon son poids moléculaire (PM) sur gel d'agarose (pulsed-field gel electrophoresis [PFGE]) avec la ddPCR. La purification de l'ADN permet d'éliminer les fractions de faible PM notamment les formes épisomales et l'ADN linéaire. La fraction de l'ADN de haut PM restante ne contenant que le provirus est ensuite quantifiée par la ddPCR (Lada et al. 2018). Lada et ses collègues ont rapporté la bonne

corrélation entre les résultats de PFGE-ddPCR et ceux de la PCR-Alu, technique la plus utilisée pour quantifier le provirus.

6.2.3 ADN VIH non intégré

Les formes d'ADN VIH non intégrées sont l'ADN linéaire et les cercles à 1 ou 2 LTR. La quantification totale de l'ADN non intégrée est possible avec différentes techniques de qPCR. Après extraction, une séparation préalable des acides nucléiques de faible PM (par rapport au provirus) par chromatographie est nécessaire avant la réaction d'amplification. Des amorces spécifiques du PBS sont utilisées afin d'amplifier les différentes formes d'ADN. La quantification spécifique des cercles à 2 LTR est possible également par qPCR en utilisant des amorces spécifiques de la région U5-U3 (*cf.* Figure 16) (Casabianca et al. 2014; Orlandi et al. 2020). L'absence d'un motif spécifique des formes épisomales à 1-LTR rend la quantification sélective de ces formes plus difficile (Yoder et Fishel 2006).



Figure 16: Représentation schématique des différentes formes d'ADN VIH quantifiables par PCR

L'amplification de l'ADN VIH total (provirus et formes non intégrées) nécessite l'utilisation des amorces au niveau du PBS (noir). L'amplification sélective des cercles 2-LTR nécessite l'utilisation d'une amorce spécifique de la région U5-U3 (gris).

6.2.4 Autres formes du réservoir viral

De nombreuses études se sont intéressées à l'ARN VIH associé aux cellules (cell associated HIV RNA, [CA-HIV-RNA]) comme biomarqueur du réservoir et de la latence virale (Pasternak et Berkhout 2018). Les CA-HIV-RNA sont composés de l'ARN extracellulaire et des ARN intracellulaires multi-épissés (mspliced RNA, [msRNA]) et non épissés (unspliced RNA, [usRNA]). Dans les cellules en phase de latence, la production virale étant bloquée, l'ARN extracellulaire décroit rapidement mais il persiste une production de msRNA et usRNA dans le cytoplasme. La quantification de ces transcrits permet d'identifier précisément les étapes où la transcription est bloquée (initiation, élongation, épissage...). Un ratio usRNA /msRNA élevé pourrait refléter la fréquence élevée de cellules infectées par le VIH durant les derniers stades du cycle de la réplication virale. Ces cellules infectées pourraient stimuler le système immunitaire provoquant ainsi une activation et une apoptose immunitaires persistantes. Ce ratio a été donc proposé comme marqueur de la pathogenèse résiduelle du VIH (Pasternak et Berkhout 2018; Faissner et al. 2014). La quantification des CA-HIV-RNA a été largement utilisée dans les essais de cure fonctionnelle afin de mesurer l'activité potentielle des agents d'inversions de la latence virale (Pasternak, Lukashov, et Berkhout 2013; Tsai et al. 2016). Plusieurs études ont montré également la forte corrélation entre la quantité de l'ADN VIH total et celle des CA-HIV-RNA dans différents sites de l'organisme (Hong et al. 2016; G. U. van Zyl et al. 2015; Scott-Algara et al. 2010). Les CA-HIV-RNA peuvent être mesurés par les techniques de qPCR ou de ddPCR au niveau des PBMC, des différentes sous-populations lymphocytaires après tri cellulaire et au niveau des différents tissus lymphatiques de l'organisme (Hong et al. 2016; Kiselinova et al. 2014). Une autre technique de culture cellulaire récemment développée permet aussi de quantifier les msRNA. C'est la technique tat/rev Induced Limiting Dilution Assay (TILDA) (cf. chapitre 6.2.5 Provirus intact inductible).

6.2.5 Provirus intact inductible

La quantification du provirus intact latent inductible est possible par la technique quantitative de Viral Out Growth Assay (QVOA). La QVOA est une technique de culture cellulaire, elle est le gold standard pour la quantification des LT CD4+ capable de se réactiver et d'induire la production de nouveaux virions (Norton et al. 2017).

Les PBMC sont collectées à partir d'individus infectés par le VIH-1 et les cellules T CD4+ au repos sont triées en fonction de leur marqueurs cellulaires (CD3+, CD4+, CD25-, CD69-, HLA-DR-). Les cellules sont ensemencées avec une dilution limite qui varie de 1 000 000 à 320 cellules par puits. Afin d'inverser la latence dans les cellules hébergeant un provirus latent inductible, les LT CD4+ sont activés avec de la phytohémagglutinine (PHA), de l'IL2 et un excès de PBMC allogéniques (déplétés de LTCD8+) irradiés provenant de donneurs sains. La réplication virale est détectée par quantification avec la technique ELISA de l'AgP24 dans les surnageants de culture (cf. Figure 17) (Falcinelli et al. 2020). Cette technique requiert un grand volume de sang (200 ml) dû au nombre très faible de cellules latentes chez les patients traités. C'est une technique très lourde et très chronophage. De plus, sa limite principale est la sous-estimation de la taille des cellules infectées par un provirus latent inductible et intact. Toutes ces cellules ne sont pas réactivées en un seul cycle d'activation. La succession de plusieurs cycles d'activation cellulaire peut être nécessaire pour obtenir une production de virus plus conséquente (Massanella et Richman 2016).

Plusieurs modifications ont été introduites dans le but d'améliorer ce test standard de QVOA et de réduire le temps de la manipulation (Norton et al. 2017). Des lignées cellulaires qui expriment des niveaux élevés de CCR5 sont ajoutées au 2^{ème} jour de la culture afin d'assurer la permissivité des cellules infectées avec celles non infectées et assurer la répétabilité de la technique (*cf.* Figure 17) (Fun et al. 2017; Laird et al. 2013).

Une autre équipe utilise un cocktail d'anticorps spécifiques pour faciliter la purification des LT CD4+ infectés (Fun et al. 2017). Kuzmichev et ses collègues stimulent les LT CD4+ avec des microbilles CD3/CD28 plutôt qu'avec de la PHA et des PBMC irradiés (Kuzmichev et al. 2017). La RT-PCR peut être aussi utilisée afin de quantifier le provirus inductible à la place de la quantification de l'AgP24. Une autre modification de la technique QVOA consiste à injecter les LT CD4+ quiescents à des souris humanisées immunodéprimées (Murine VOA). L'activation des cellules latentes se fait par des anticorps anti-CD3 humains. La mesure de l'activité réplicative des cellules se fait par la quantification de la CVp (Metcalf Pate et al. 2015). Cette nouvelle technique a été décrite comme étant plus sensible que la technique classique (Metcalf Pate et Blankson 2017).

Les différentes méthodes d'optimisation des techniques QVOA et MVOA visent à les simplifier afin de pouvoir les utiliser dans de larges essais cliniques, ainsi que dans le cadre de suivi des patients des essais de cure fonctionnelle.

La technique TILDA se base sur le même principe que celui de la QVOA. C'est une technique de dilution limite qui mesure la fréquence des LT CD4+ produisant des transcrits rev/tat (msRNA) soit en l'absence de stimulation, soit après stimulation avec un puissant agent mitogène (phorbol 12-myristate 13-acétate-PMA - et ionomycine). La mesure de la quantité des transcrits rev/tat se fait par qPCR. La technique TILDA est plus simple à mettre en œuvre que la QVOA surtout dans le cadre de larges essais cliniques Elle ne comporte qu'une seule étape de culture cellulaire et nécessite une quantité moindre de matériel biologique (10 à 20 ml versus 200 ml pour la QVOA) (Frank et al. 2019).



Figure 17: Schématisation du test de culture cellulaire quantitatif Viral Outgrowth Assay

La quantification du provirus intact latent inductible est possible par la technique de culture cellulaire : Viral Outgrowth Assay. C'est une technique de dilution limite des lymphocytes T CD4+ latents. Les cellules cibles ajoutées avec la culture des lymphocytes CD4+ infectés peuvent être des lymphoblastes ou des cellules MOLT-4/CCR5 de donneurs sains. La quantification de l'activité réplicative des lymphocytes infectés peut être réalisée soit par le dosage de l'antigène p24 ou par qPCR (Laird et al. 2016).

6.3 ANALYSE QUALITATIVE DU RESERVOIR VIRAL

Le séquençage du génome complet du VIH permet une caractérisation plus fine du réservoir viral. Les techniques de nouvelle génération (NGS : Next-Generation Sequencing) permettent de différencier le réservoir fonctionnel (provirus intact capable de se répliquer et de donner naissance à des nouveaux virions) de celui défectif (Ho et al. 2013; Bruner et al. 2016; Hiener et al. 2017; Hong et al. 2016). Des étapes de dilutions limites et d'amplification de l'ADN VIH sont nécessaires au préalable de la technique du séquençage (Wang et al. 2018). Le séquençage à haut débit peut être réalisé au niveau des PBMC et des différentes sous-populations lymphocytaires après tri cellulaire (Hiener et al. 2017; Lee et al. 2017).

La proportion du provirus intact et défectif est variable selon la phase de l'infection et la souspopulation lymphocytaire étudiée. Lee et *al.* ont rapporté que seulement 5% des provirus étudiés sont intacts. 65% des séquences intactes ont été retrouvées dans les cellules Th1 (Lee et al. 2017). Ho et ses collaborateurs ont montré que 10 % des 213 ADN viraux isolés de 8 patients traités sont intacts (Ho et al. 2013). Dans les travaux de Bruner et *al.*, le provirus intact varie entre 2% et 7% chez des patients traités durant la phase chronique de la maladie et durant la PHI respectivement (Bruner et al. 2016). Hiener et ses collaborateurs ont montré que cette proportion varie entre 3% et 6% en phase chronique ou en phase aigüe respectivement (Hiener et al. 2017).

Toutes ces études ont décrit avec des proportions différentes les mêmes défauts génétiques rendant le provirus défectif (cf. Figure 11). Ces défauts génétiques consistent principalement en de larges délétions, des hypermutations G vers A et des codons stop, des mutations au niveau du site majeur d'épissage et celui d'encapsidation, des inversions internes et des mutations ponctuelles décalant le cadre de lecture (Ho et al. 2013; Bruner et al. 2016; Lee et al. 2017; Hiener et al. 2017)

La variation des proportions de l'ADN intégré intact et celui défectif dans les différentes études peut être expliquée par la variabilité des méthodes d'amplification et des techniques de séquençage à haut débit (Wang et al. 2018).

Les différentes techniques de séquençage apportent principalement une information qualitative sur le réservoir viral. La quantification de ce réservoir est relative permettant d'estimer la proportion de l'ADN intact par rapport à l'ADN défectif. Bruner et ses collègues ont récemment optimisé une ddPCR afin de pouvoir quantifier la proportion des hypermutations et des délétions dans le génome viral intégré. Deux amplicons sont couplés, l'un ciblant le signal d'encapsidation Ψ et l'autre le gène env. Des sondes d'hybridation détectent les mutations d'un site de liaison de la protéine APOBEC3G proche du RRE et qui serait muté sur la majorité des génomes porteurs d'hypermutations (Bruner et al. 2019).

6.4 Marqueurs cellulaires du réservoir

La caractérisation de biomarqueurs cellulaires permettant de mieux identifier les cellules réservoirs quiescentes est primordial pour le développement de nouvelles stratégies de cure fonctionnelle.

Les principales molécules « immune checkpoint » identifiées au cours de ces dernières années sont Programmed cell death protein 1 (PD-1), cytotoxic T lymphocyte antigen 4 (CTLA4), lymphocyte activation gene 3 protein (LAG3) et T cell immunoglobulin and mucin 3 (TIM3) et T cell immunoglobulin and ITIM domain (TIGIT). Ce sont des protéines régulatrices et inhibitrices des lymphocytes initialement étudiées dans le domaine de l'oncologie. Des preuves récentes montrent leur rôle crucial au cours des infections virales et surtout au cours de l'infection VIH (Johnson, Sullivan, et Menzies 2017). Ces molécules sont impliquées dans la régulation négative de l'activation, de la prolifération et de la différenciation des cellules T en réponse à la stimulation antigénique par le virus du VIH (Sperk, Domselaar, et Neogi 2018; Ando et al. 2020; Petrovas et al. 2006; Wykes et Lewin 2018).

PD-1 est une protéine majeure de la régulation des fonctions et de l'exhaustion des LT au cours de la phase chronique de l'infection (Day et al. 2006; Nicholas et al. 2013). Elle est responsable de la déplétion des LB. Le taux d'expression de PD-1 augmente dans les monocytes, les CD et les macrophages chez les PVVIH (Titanji et al. 2010; Meier et al. 2008). Un taux élevé de PD-L1 et PD-L2 (ligands du PD1) a été observé chez des patients virémiques (Velu et al. 2015). L'exposition continue à l'antigène pourrait expliquer le niveau élevé de ces molécules (Agata et al. 1996). Une étude de blocage de la voie PD-1 avec des anticorps anti-PD-1 a rapporté l'augmentation de l'activité prolifératrice et cytotoxique des LT CD4+ et CD8+ ainsi que l'activité sécrétrice des immunoglobulines par les LB (Trautmann et al. 2006).

CTLA4 est souvent co-exprimé avec PD-1 sur les cellules T CD4+ spécifiques du VIH. Le blocage de la voie CTLA4 seul ou en combinaison avec le blocage de PD-1 a augmenté la prolifération des cellules T CD4+ spécifiques du VIH in vitro (Kaufmann et al. 2007).

La molécule **LAG3** est moins étudiée que PD-1 et CTLA4. Tian et *al*. ont observé une augmentation de ce marqueur sur différentes cellules immunitaires chez des patients infectés par le VIH (Tian et al. 2015).

Les taux plasmatiques et cellulaires de ces molécules sont positivement corrélés avec la CVp et négativement corrélés avec le nombre de LT CD4+ chez les patients VIH. Leur taux plasmatique et leur expression sur les différentes cellules immunitaires diminuent chez les patients sous ART. Le niveau d'expression de tous ces marqueurs est alors corrélé avec la progression de l'infection et pourrait donc être utilisé comme marqueur de gravité de la maladie et comme biomarqueur des cellules infectées par le VIH (Kaufmann et al. 2007; Trautmann et al. 2006; Tian et al. 2015).

Dans le cadre de l'étude SPARTAC, les niveaux de CVp, LT CD4+, ADN VIH, PD-1, LAG3 et TIM3 ont été mesurés chez des patients traités au cours de la PHI. Le traitement a été maintenu durant 48 semaines et interrompu par la suite. Le temps jusqu'au rebond virologique (défini par une CVp> 400 copies/ml) a été mesuré en plus de plusieurs paramètres biologiques.

Hurst et ses collaborateurs ont rapporté que les niveaux pré-thérapeutiques de PD-1, LAG3 et TIM3 sur LT CD4+ et ceux de PD-1 et LAG3 sur les LT CD8+ étaient prédictifs du temps nécessaire pour le rebond virologique. Ils ont également décrit la corrélation entre les niveaux d'ADN et ces différents « immune checkpoint » (Hurst et al. 2015). Fromentin et *al*. ont mesuré le niveau d'expression de 7 molécules « immune checkpoint » (PD-1, CTLA-4, LAG-3, TIGIT, TIM-3, CD160 et CD22 ou 2B4) ainsi que la quantité de 4 marqueurs du réservoir viral

(ADN VIH intégré et total, cercles 2-LTR et CA-HIV-RNA) dans les PBMC de 48 patients en suppression virologique. Le taux de PD-1, TIGIT et LAG-3 était positivement corrélé avec l'ADN VIH intégré. Les cellules T CD4+ co-exprimant ces trois marqueurs contenaient 8 fois plus de génomes viraux intégrés par rapport au nombre total des LT CD4+ (Fromentin et al.

2016). Ces résultats suggèrent que la taille du réservoir du VIH pourrait être corrélée avec le niveau de ces différentes molécules immuno-inhibitrices et que ces « immune checkpoints » peuvent être utilisés comme biomarqueurs des cellules infectées par le VIH.

Descours et ses collègues ont suggéré que la molécule **CD32a** est un marqueur cellulaire des LT CD4+ hébergeant du provirus compétent pour une réplication virale (Descours et al. 2017).

Ce marqueur a suscité de nombreuses controverses car ces cellules CD32a+ expriment d'autres marqueurs d'activation cellulaires qui ne sont pas des marqueurs du réservoir viral (Badia et al. 2018; M. García et al. 2018). De plus, Bertagnolli et al. ont montré par technique QVOA que ces cellules CD4+ CD32a+ n'hébergent pas la majorité du provirus intact (Bertagnolli et al. 2018).

6.5 Dynamique du réservoir viral au cours de l'infection VIH

L'étude de la dynamique du réservoir viral au cours de l'infection VIH dans différentes situations cliniques est primordiale afin de bien comprendre la physiopathologie de la maladie, d'explorer de grandes cohortes de patients, et d'évaluer l'impact des différentes combinaisons thérapeutiques sur le réservoir (Rouzioux et Avettand-Fénoël 2009). La quantification de l'ADN VIH total dans les PBMC est une technique simple, reproductible et très utilisée dans de nombreuses études et essais cliniques.

6.5.1 Evolution en histoire naturelle de l'infection

6.5.1.1 Primo-Infection

L'établissement et l'enrichissement du réservoir viral dans les cellules du sang périphérique et les tissus lymphoïdes commence très tôt durant la PHI (Schacker et al. 2000; T. W. Chun et al. 1998). Dans le cadre de la cohorte ANRS PRIMO, 674 patients ont été inclus durant les phases précoces de l'infection entre 1996-2006. Le temps médian entre le début de l'infection et l'inclusion des patients était de 47 jours. Des niveaux très élevés d'ADN VIH total (médiane de 3,3 log₁₀ copies/10⁶ PBMC) ont été retrouvés dans le sang périphérique (c*f*. Figure 18). La CV-ADN dans les PBMC était négativement corrélée avec le nombre des bandes sur le WB et la durée de l'infection. La forte corrélation entre la CVp et la quantité

totale d'ADN VIH au cours de la PHI a été également décrite (Ghosn et al. 2010; Goujard et al. 2006).

La quantification longitudinale de l'ADN VIH total et de l'ADN intégré chez 74 patients inclus préalablement dans la cohorte ANRS PRIMO a montré que la quantité totale de l'ADN était très élevée (médiane égale à 3,59 \log_{10} copies/10⁶ PBMC). En revanche, la quantité de l'ADN intégré était plus faible (médiane égale à 2,15 \log_{10} copies/10⁶ PBMC) durant la PHI (Trémeaux et al. 2019).

Ananworanich et *al.* ont comparé les niveaux de l'ADN VIH total au niveau du sang et au niveau du GALT chez 268 patients (44 en stade Fiebig I et 224 aux stades Fiebig II-IV) inclus dans la cohorte Thaïlandaise RV254/SEARCH010. Les individus au stade Fiebig I avaient une médiane de CV ADN VIH totale inférieure au niveau des PBMC (3 vs 190 copies/ 10^6 cellules) et au niveau des intestin (0 vs 898 copies/ 10^6 cellules) par rapport aux individus en stades Fiebig II – IV (P <0,01). Ces résultats confirment l'établissement rapide du réservoir au niveau du sang et des tissus lymphoïdes durant les phases très précoces de la PHI ; cependant, le niveau d'ADN VIH total plus bas durant le stade Fiebig I par rapport aux autres stades peut être expliqué par la courte durée d'exposition de l'organisme au virus estimée dans cette étude à 6 jours de contamination (Ananworanich et al. 2016).

Plusieurs études considèrent que les niveaux de CV ADN VIH au cours des phases précoces de l'infection seraient des facteurs prédictifs indépendants de la progression de la maladie vers le stade SIDA (Rouzioux et al. 2005; Ghosn et al. 2010). Ghosn et ses collaborateurs rapportent qu'un niveau d'ADN total dans le sang > 3,4 log₁₀ copies/ 10^6 PBMC en absence de traitement est corrélé avec 62% de risque de progression de la maladie 2 ans suivant la contamination (Ghosn et al. 2010).

6.5.1.2 Phase Chronique

La quantification de la CV ADN a été faite chez 383 patients séropositifs inclus dans la cohorte multicentrique prospective ANRS SEROCO ayant pour but d'étudier la progression naturelle de la maladie chez ces patients. 271 patients ont été prélevés entre 6 et 24 mois suivant la contamination. Le niveau d'ADN dans les PBMC était entre 0,70 et 4,02 \log_{10} copies/10⁶ PBMC (médiane égale à 2,86 \log_{10} copies/10⁶ PBMC) (c*f.* Figure 18). Ce niveau d'ADN était comparable en médiane (2,86 vs 2,85 \log_{10} copies/10⁶ PBMC) avec celui de 112

patients inclus durant les 6 premiers mois suivant la contamination (Rouzioux et al. 2005). Le suivi longitudinal de 97 patients inclus dans cette cohorte montre l'augmentation significative des niveaux d'ADN VIH total et intégré en l'absence de traitement (Trémeaux et al. 2019). Compte tenu des indications mondiales de l'instauration rapide des ARTs, les études portant sur les différentes formes du réservoir chez des patients en phase chronique de la maladie en l'absence de traitement sont très limitées.

6.5.1.3 Cas particulier des enfants

L'étude ANRS 1244/1278 est une étude rétrospective de suivi d'enfants infectés par le VIH entre 2000 et 2004 en Côte d'Ivoire dans le cadre du programme « Enfant Yopougon ». Elle avait comme objectif de quantifier la CV ADN totale en pré-thérapeutique et d'évaluer l'impact des ARTs sur le réservoir viral. 121 enfants ont été inclus durant des stades avancés de la maladie (46,6% et 20,3% durant les stades B et C respectivement) selon la classification du Centers for Disease Control and Prevention (CDC). L'âge médian des enfants était de 6 ans (IQR 3,5-9). La CV ADN totale de base était égale à 3,4 log₁₀ copies/10⁶ PBMC (IQR 3,1-3,6) (cf. Figure 18). Aucune différence significative de la quantité d'ADN totale n'a été observée en fonction du stade de la maladie (la médiane de la CV ADN totale dans les PBMC exprimée en \log_{10} copies/10⁶ PBMC était égale à 3,37 [IQR 3,07–3,61]; 3,41 [IQR 3,19– 3,64] et 3,29 [IQR 2,89–3,72] respectivement durant les stades A, B et C du CDC). 54 enfants ont initié un ART et ont été suivis durant 36 mois. La CV ADN pré-thérapeutique était en médiane égale à 3,4 log₁₀ copies/10⁶ PBMC (IQR 3,2–3,7). Cette quantité d'ADN totale a diminué de 0,28 log₁₀ (IQR 0,00–0,72) et de 0,32 log₁₀ (IQR 0,08–0,57), après 12 et 24 mois de traitement par ART respectivement (Boullé et al. 2014). Ces résultats montrent qu'en absence de traitement, la CV ADN totale chez les enfants est élevée et peut être comparable à celle trouvée chez les adultes. La diminution de la quantité d'ADN VIH grâce aux ARTs souligne l'importance de l'initiation rapide des traitements afin de limiter la taille du réservoir chez les enfants ainsi que les adultes (cf. chapitre 6.5.2 Evolution du réservoir sous traitement antirétroviral).

6.5.2 Evolution du réservoir sous traitement antirétroviral

Les effets bénéfiques des ARTs sur la restauration de la réponse immunitaire de l'hôte, le contrôle de la CVp au long cours et la diminution de la mortalité ont été largement étudiés (Rosenberg et al. 1997; Timité-Konan et al. 2003; Buzon, Martin-Gayo, et al. 2014; Moir et Fauci 2017)

Les données qui suivent ne concernent que l'impact du traitement sur le réservoir viral, principalement au niveau du sang périphérique.

La diminution de l'ADN VIH dans le sang total chez les patients adhérant au traitement a été largement décrite chez les adultes et les enfants (Garrigue et al. 2000; Yerly et al. 2000; Karlsson et al. 2001; De Rossi et al. 2002; Viard et al. 2004; Hoen et al. 2007; Jain et al. 2013).

Hocqueloux et ses collègues ont étudié la dynamique du réservoir viral dans le sang chez 307 patients entre 2005 et 2011. 272 patients ont été traités durant la phase chronique de la maladie et 35 patients (10%, 10%, 26% et 54% aux stades Fiebig II, III, IV et V respectivement) ont été traités durant les phases précoces de l'infection. Le suivi longitudinal de la CV ADN montre sa décroissance dans les deux groupes de patients grâce aux effets bénéfiques du traitement. La modélisation mathématique de cette décroissance a été décrite comme biphasique car elle était très rapide durant les deux premières années d'étude avec une demi-vie presque similaire (113 jours et 146 jours chez les patients en PHI ou chronique respectivement). Selon ce modèle mathématique, la deuxième phase de décroissance est plus lente et significativement plus courte (P <0,001) chez les patients traités en PHI (estimée à 25 ans) que chez ceux traités tardivement (estimée à 377 ans). A la fin du suivi, les patients en PHI avaient des taux d'ADN VIH significativement plus faibles (P < 0.0001) que les patients traités tardivement (médiane de la CV ADN était égale à 2,15 log₁₀ copies/10⁶ PBMC [IQR 1,7-2,47] vs 2,84 log₁₀ copies/10⁶ PBMC [IQR 2,52-3,09]) (cf. Figure 18). L'ADN VIH était indétectable chez 69% (24/35) des patients en PHI contre seulement 13% (35/272) des patients en phase chronique. L'initiation des ARTs durant la PHI, un nadir CD4+ élevé (>500 cellules/mm³) et un niveau d'ADN VIH pré-thérapeutique <3,3 log10 copies/106 PBMC étaient prédictifs de l'atteinte d'une CV ADN VIH indétectable durant la thérapie antivirale (Hocqueloux et al. 2013).

L'essai randomisé multicentrique OPTIPRIM avait comme objectif d'évaluer l'impact d'un traitement initié au cours de la PHI sur les niveaux de l'ADN-VIH. Les patients étaient randomisés dans deux bras selon le nombre de molécule antirétrovirales. 45 patients étaient traités par une trithérapie de TDF/FTC+ DRV/r et 45 autres avaient bénéficié d'une intensification de la trithérapie avec du RAL et du MVC (TDF/FTC+ DRV/r+ RAL+ MVC). Le niveau de base de l'ADN VIH était égal en médiane à 3,52 log₁₀ copies/10⁶ PBMC (IQR 3,26-3,94) et 3,6 log₁₀ copies/10⁶ PBMC (IQR 3,35-4,02) dans le groupe sous trithérapie et celui sous pentathérapie respectivement. Après 2 ans sous ARTs, la CV ADN VIH décroit de façon similaire dans les 2 bras d'études : médiane 2,35 log₁₀ copies/10⁶ PBMC (IQR 2,05-2,50) dans le premier groupe vs 2,25 log₁₀ copies/10⁶ PBMC (1,71-2,55) dans le groupe en intensification thérapeutique (cf. Figure 18) (Chéret, Nembot, et al. 2015).

Dans le cadre de la même étude, Chéret et ses collaborateurs ont étudié le réservoir viral dans le liquide séminal chez 19 patients (7 sous trithérapie et 12 sous pentathérapie). L'ADN VIH n'a été détecté que chez 10 patients à baseline. La CV ADN dans le liquide séminal décroit significativement et de façon concomitante avec celle dans le sang périphérique durant les 2 ans de traitement (Chéret et al. 2017).

Les résultats de ces deux études confirment le bénéfice des ARTs débutés durant la PHI afin de limiter la taille du réservoir dans le sang périphérique et le liquide séminal.

Ananworanich et *al.* ont évalué l'impact de 24 semaines d'une pentathérapie (TDF/FTC+EFV+RAL+MVC) sur le niveau du réservoir viral dans des biopsies coliques chez 7 patients traités en PHI. La CV ADN VIH totale a baissé de façon significative chez 3/7 patients dans le GALT après 24 semaines de traitement. Cette décroissance est associée à la diminution de l'activation des LT CD8+ et de la restauration du nombre de TEM et TCM au niveau de la muqueuse colique (Ananworanich et al. 2012)

Avettand-Fenoel et *al.* ont rapporté un niveau très élevé de réservoir viral chez 44 patients en stade SIDA avec une $CVp > 4 \log_{10}$ copies/ml et un nombre de $CD4+ \le 200$ cellules/mm³. Chez ces patients en multi-échec de traitement, la CV ADN VIH atteint 3,44 \log_{10} copies/10⁶ PBMC (*cf.* Figure 18) (Avettand-Fenoel et al. 2010).

Toutes ces données présentées soulignent l'importance de l'initiation rapide du traitement durant les phases précoces de la maladie afin de limiter la taille du réservoir viral dans le sang périphérique ainsi qu'au niveau des différents compartiments de l'organisme. En revanche, l'arrêt du traitement même initié très tôt se traduit par un rebond virologique et une réactivation de l'infection (Kaufmann, Lichterfeld, et al. 2004; T.-W. Chun et al. 2010; Hamlyn et al. 2012; Colby et al. 2018).

6.5.3 Particularité des patients contrôleurs

Les patients dits « contrôleurs naturels » de l'infection (HICs : HIV controllers) ont la capacité de maintenir une CVp très faible (<400 copies/ml) ou indétectable en absence de traitement anti-VIH. Le nombre de ces patients ne dépasse pas 1% du nombre total des patients séropositifs. L'étude des caractéristiques immuno-virologiques a été faite chez 15 patients HICs. La quantification de la CV ADN VIH au niveau du sang périphérique était très basse (1,5 (IQR 0-2,4) log₁₀ copies/10⁶ PBMC) (cf. Figure 18). L'analyse longitudinale de la taille du réservoir faite chez 7 patients a montré que la CV ADN VIH reste stable au cours du temps (Lambotte et al. 2005). L'analyse phénotypique du HLA chez 6 patients a montré la surexpression des allèles protecteurs HLA-B*57 et HLA-B*27 chez 5 et 3 patients respectivement. Lambotte et ses collègues ont supposé que le contrôle de l'infection et de la taille très faible du réservoir chez les HICs font intervenir plusieurs facteurs, notamment des facteurs liés au virus (atténuation des souches virales à cause des mutations au niveau des gènes nef et vpr) et des facteurs liés à l'hôte (diminution de la susceptibilité cellulaire au VIH grâce à l'action de certains FRC, surexpression des HLA protecteurs et augmentation de l'activation et de la capacité suppressive des LT CD8+) (Lambotte et al. 2005). Néanmoins, ce groupe de patients HICs est très hétérogène et le risque de la progression de la maladie est variable. Certains patients contrôlent efficacement la maladie tandis que d'autres patients subissent une progression immunologique et/ou virologique de l'infection (Noel et al. 2015). L'analyse longitudinale du réservoir viral a été faite chez 202 patients HICs inclus dans la cohorte ANRS-CODEX. Les patients n'ont jamais été traités pendant au moins 5 ans et

avaient une CVp < 400 copies/ml. 42% des patients avaient des allèles protecteurs (28 HLA-

B*27, 54 HLA- B*57, 3 HLA- B*27 et B*57). Au moment de l'inclusion, les niveaux de l'ADN VIH étaient très bas (1,5 (IQR 1,3-1,9) \log_{10} copies/10⁶ PBMC). Soixante patients avaient une CV ADN indétectable. Le suivi à long terme de la dynamique du réservoir sanguin montre des niveaux très faibles de l'ADN VIH, qui diminuent au cours du temps. 88 HICs avaient un ADN VIH indétectable. Cette décroissance est associée à une CVp initiale et une proportion de LT CD4+ plus faibles lors de l'inclusion dans la cohorte, ainsi qu'à une surreprésentation des allèles protecteurs de HLA. Par contre, la CV de l'ADN VIH augmente de façon modeste et progressive chez certains patients. Cette augmentation est associée à plusieurs rebonds virologiques, à un taux d'IP10 élevé et à une forte réponse CD8+ spécifique (Avettand-Fenoel et al. 2019).

Un autre groupe de patients dits « contrôleurs post traitement » de l'infection a été décrit. Ces patients sont traités rapidement durant la PHI. Ils sont capables de maintenir un contrôle immuno-virologique de l'infection suite à l'arrêt du traitement. Dans le cadre de l'étude VISCONTI (Viro-Immunological Sustained CONtrol after Treatment Interruption) les caractéristiques virologiques et immunologiques des patients capables de contrôler l'infection après interruption thérapeutique ont été décrites. 14 patients définis comme « post-treatment controllers » (PTCs) diagnostiqués en PHI (1, 3, 1 et 9 patients aux stades Fiebig I, III, IV et V respectivement), traités rapidement (durant les 10 premières semaines de l'infection) et gardant une CVp < 400 copies/ml pendant au moins 24 mois d'arrêt de traitement ont été inclus. Les patients avaient une CVp très élevée à l'inclusion (médiane de 5 log₁₀ copies/ml) et un taux de CD4+ moyennement bas (502 cellules/mm³ en médiane). La durée médiane du traitement était de 36,5 mois et la durée médiane de l'obtention d'une CVp indétectable était de 3 mois. La médiane de la CV de l'ADN VIH total était très faible (médiane de 1,71 log₁₀ copies/10⁶ PBMC) durant la période du contrôle de l'infection (estimée à 89 mois) (cf. Figure 18). La mesure longitudinale des taux de l'ADN VIH a été faite chez 8 PTCs après interruption thérapeutique. Les niveaux de l'ADN VIH ont continué à baisser progressivement chez 5 PTCs. En revanche, ils étaient stables chez 2 PTCs avec une augmentation minime chez un seul PTC probablement liée à une réplication virale détectable durant le suivi.

Les PTCs ne sont pas caractérisés par la surexpression des allèles protecteurs de HLA de classe I (HLA-B*27 et HLA-B*57) comme les contrôleurs naturels de l'infection. Un seul

PTC avait un allèle HLA-B*57 et deux PTC avaient un allèle HLA-B*27. Cependant, les allèles de risque HLA-B*07 et HLA-B*35 étaient très répandus dans le groupe PTC (29% de tous les allèles HLA-B). Les capacités d'activation et de suppression des LT CD8+ étaient faibles chez ces patients en comparaison avec les contrôleurs naturels. Sáez-Cirión et ses collaborateurs ont supposé que le contrôle virologique chez les PTCs est en partie réalisé grâce à l'initiation précoce des ARTs (Sáez-Cirión et al. 2013).

Toutes ces données soulignent l'intérêt du traitement rapide des patients durant les phases initiales de la maladie, surtout chez les PTCs qui ont un réservoir viral extrêmement bas au niveau du sang périphérique et qui continue à diminuer progressivement même après une interruption thérapeutique à long terme.

La comparaison des niveaux de l'ADN VIH dans le sang périphérique mesurés avec la même technique de qPCR, dans différentes situations cliniques montrent que les HICs et les PTCs ont une taille de réservoir plus basse par rapport aux autres différents profils de patients (cf. Figure 18). Les mécanismes exacts du contrôle de l'infection et du réservoir viral faible chez les contrôleurs naturels de l'infection ou les contrôleurs post-interruption thérapeutique demeurent non élucidés. D'autres investigations sont nécessaires afin de mieux caractériser ces mécanismes ainsi que le profil de ces patients qui peuvent être une cible potentielle des stratégies de cure fonctionnelle du VIH.



Figure 18: Charge virale ADN total sanguine dans différentes situations cliniques

La charge virale ADN total sanguine est exprimée en médiane avec les interquartiles Q1 et Q3. n représente le nombre de patient inclus dans chaque étude. Les différentes études représentées sont comparables du fait de l'utilisation de la même technique de quantification de l'ADN VIH total (Avettand-Fènoël et al. 2016; Trémeaux, Rouzioux, et Avettand-Fènoël 2019).

7 Apolipoprotein B mRNA-Editing Catalytic Polypeptide-like

Plusieurs FRC impliqués dans la défense de l'hôte ont été décrits (c*f*. Chapitre 3 Cycle de réplication viral et facteurs de restriction cellulaire).

Au cours de ce travail de thèse, nous nous sommes intéressés au mécanisme d'action des APOBEC3 et à leur impact sur le réservoir viral au cours de l'infection VIH.

Les Apolipoprotein B mRNA-Editing Catalytic polypeptide-Like (APOBEC) sont une large famille d'enzymes de restriction cellulaire. Cette famille protéique très étudiée dans le domaine de l'oncologie et de la virologie est constituée de 11 enzymes distinctes : APOBEC1, APOBEC2, APOBEC3A, APOBEC3B, APOBEC3C, APOBEC3D, APOBEC3F,

APOBEC3G, APOBEC3H, APOBEC4 et activation-induced cytidine deaminase (AICDA) (Olson, Harris, et Harki 2018; Xu, Byun, et Dudley 2020).

Les apolipoprotéines APOBEC3D, APOBEC3F, APOBEC3G et APOBEC3H ont été étudiées au cours de l'infection VIH (Harris et Liddament 2004; Marin et al. 2003; Harris et Dudley 2015; Olson, Harris, et Harki 2018). Les données qui suivent ne concernent que ces 4 enzymes impliquées dans la restriction du cycle de la réplication du VIH-1.

Les APOBEC3 ont une activité catalytique cellulaire dépendante du zinc. Ce sont des FRC via leur activité principale de cytidine désaminase transformant les résidus de cytosine (C) en uracile (U). Au cours du cycle de la réplication du VIH et lors de la rétrotranscription, la désamination des (C) entraine l'accumulation des résidus d'(U). La TI reconnait l'(U) comme une thymine (T). Lors de la synthèse du brin d'ADN complémentaire, au lieu d'incorporer la guanine (G) comme base complémentaire de la (C), la TI incorpore l'adénine (A) comme base complémentaire à l'(U). Le résultat de cette activité de désamination des APOBEC3 est la production de mutations G vers A (cf. Figure 19) (Harris et Liddament 2004). Les hypermutations sont définies par un nombre très élevé de transitions (G) vers (A) (Harris et Liddament 2004).

Les APOBEC3 ciblent différents contextes nucléotidiques : APOBEC3D/H/F ont une préférence d'action sur la séquence dinucléotidique 5'-TC tandis que APOBEC3G a une préférence d'action sur la séquence dinucléotidique 5'CC. Le résultat de la désamination de la (C) en (U) sera 5'-TU (5'TT) et 5'CU (5'CT) respectivement. La synthèse du brin d'ADN complémentaire conduit alors aux mutations 5'-GA en AA et 5'-GG en AG (Harris et Liddament 2004; Xu, Byun, et Dudley 2020).

La conséquence principale des nombreuses mutations G vers A au niveau du provirus consiste à la production de nouveaux virus défectifs comportant plusieurs codons stops. Ces nouveaux virions défectifs ont une capacité réplicative inhibée qui entrainent à la production de nouvelles protéines non fonctionnelles (Cullen 2006). Yang et *al*. ont montré aussi que l'accumulation des dérivés (U) au niveau de l'ADN viral peut déclencher le recrutement de facteurs de la machinerie cellulaire pour la réparation et la dégradation de cet ADN nouvellement synthétisé. Cette réparation est orchestrée par l'uracil DNA glycosylases-2 (UNG2) et l'apurinic/apyrimidinic endonuclease (APE). La plupart des bases (U) dans l'ADN générées par APOBEC3 seront d'abord éliminées par excision de UNG2 associé au virion, puis dégradées par l'APE avant le processus d'intégration (Yang et al. 2007).

Un autre mécanisme d'inhibition de la réplication virale par les APOBEC3 a été décrit par Nowarski et *al.* (Nowarski et al. 2014). Ces apolipoprotéines interfèrent avec l'activité transcriptionelle précoce du VIH-1. Le début de la transcription du provirus nécessite le recrutement de l'ARN polymérase II cellulaire au niveau de la « TATA Box ». La protéine Tat transactive le LTR en se fixant sur la région TAR et augmente de façon exponentielle la transcription de l'ADN viral. La séquence nucléotidique du TAR constitue une cible pour les APOBEC3. Ces FRC convertissent le (G) au niveau du 5'-CTGGGA-3' en (A) conduisant ainsi à l'interruption de la liaison des facteurs d'activation cellulaire sur le TAR tel que le « positive Transcription Elongation Factor » (pTEFb). Par conséquent, la transcription virale est inhibée, les transcrits viraux de petites tailles s'accumulent et la réplication virale est ainsi bloquée (Nowarski et al. 2014; Xu, Byun, et Dudley 2020).

L'activité antivirale des APOBEC3G/F n'est pas restreinte à leur capacité de produire des mutations (G) vers (A). D'autres mécanismes d'action dits « cytidine désaminase indépendants » ont été décrits (Bishop, Holmes, et Malim 2006; Newman et al. 2005; Iwatani et al. 2007; Guo et al. 2007; Pollpeter et al. 2018; Bieniasz 2018; Mbisa, Bu, et Pathak 2010; Holmes et al. 2007; Luo et al. 2007; Li et al. 2007).

Ces apolipoprotéines se fixent directement sur l'ARN génomique. Elles bloquent par encombrement stérique la fixation de la TI sur l'ARN nécessaire pour le début de la rétrotranscription (Iwatani et al. 2007; Bishop, Holmes, et Malim 2006; Newman et al. 2005). D'autres études plus récentes ont montré que les APOBEC3G/F peuvent se fixer directement sur la TI et déstabiliser son activité de rétrotranscription (Pollpeter et al. 2018; Bieniasz 2018). Le résultat qui découle de tous ces processus est une synthèse d'ADN viral réduite ainsi qu'un défaut de transfert et d'intégration de l'ADN-VIH dans le génome de la cellule hôte.

Les APOBEC3F/G peuvent également interférer avec le processus d'intégration du génome viral préalablement décrit (cf. chapitre 3.3 Intégration du génome viral) et la formation du
provirus. L'intégration de l'ADN viral dans le génome de l'hôte nécessite le clivage de quelques nucléotides aux extrémités du LTR grâce à l'activité exonucléasique 3' de l'IN (mécanisme appelé « 3' processing »). Cette étape est suivie par le transfert du brin d'ADN dans le noyau afin de l'intégrer dans le génome de la cellule hôte. L'APOBEC3G inhibe le 3'processing suite à l'intégration de 6 pb à l'extrémité 3' de U5. Cette extension nucléotidique de l'ADN viral diminue l'affinité de l'IN à son substrat ce qui déstabilise son activité exonucléasique indispensable pour l'intégration du génome viral (Mbisa et al. 2007; Mbisa, Bu, et Pathak 2010). Les APOBEC3G/F interfèrent aussi avec le transfert de l'ADN viral dans le noyau de l'hôte. Le mécanisme exact de cette inhibition n'a pas encore été bien élucidé (Li et al. 2007).



Figure 19: Mécanisme d'action des APOBEC3 au cours du cycle de la réplication du VIH

A3D, A3F, A3G et A3H : APOBEC3D/F/G/H, Core-Binding Factor beta (CBFβ), Cullin–RING Ligase 5 (CRL5), Cullin 5 (CUL5), Elongin B (ELOB), Elongin C (ELOC), RING-Box 2 (RBX2). (Olson, Harris, et Harki 2018)

L'activité des APOBEC3 est contrecarrée par Vif, ce facteur d'infectivité viral prévient les hypermutations afin d'assurer une réplication virale efficace. L'inhibition des APOBEC3 par Vif se fait par dégradation protéasomique suite à la formation d'un complexe d'ubiquitine ligase. Par hétérodimérisation avec le cofacteur de transcription : le Core-Binding Factor beta (CBFβ), Vif recrute le complexe Cullin–RING Ligase 5 (CRL5) comportant la Cullin 5 (CUL5), l'Elongin B (ELOB), l'Elongin C (ELOC), et la protéine RING-Box 2 (RBX2) (cf. Figure 19). Les APOBEC3 subissent une polyubiquitylation par ce complexe d'ubiquitine ligase conduisant à leur protéolyse (Mehle et al. 2004; Marin et al. 2003; Jäger et al. 2011; Goila-Gaur et Strebel 2008). L'ubiquitylation des APOBEC3 se produit au niveau des résidus lysine principalement au niveau de la région C-terminale. La substitution de la lysine à l'arginine à ce niveau augmente la résistance de ces apolipoprotéines à Vif (Turner et al. 2016). Plusieurs FRC tels que USP49, MAP3 kinase, Cyclin F protein, HDAC6 ont été décrits comme facteurs déstabilisateurs de l'activité de Vif, augmentant ainsi la résistance des APOBEC3 à la dégradation protéasomique (Pan et al. 2019; Miyakawa et al. 2015; Augustine et al. 2017; Valera et al. 2015).

L'impact des effets délétères des APOBEC3 sur le VIH-1 a été largement étudié chez les PVVIH. Les taux des provirus défectifs à cause des hypermutations au niveau des PBMC peuvent atteindre les 43%. Ces taux varient en fonction du stade de la maladie, de la région étudiée du génome et des différentes techniques utilisées (Janini et al. 2001; Hiener et al. 2017; Bruner et al. 2016; Lee et al. 2019).

Janini et ses collaborateurs ont séquencé le gène de la PR chez 53 patients (27 et 26 patients durant les stades précoces et SIDA). 43% des séquences étaient hypermutées sans différence significative entre les deux stades de la maladie (44% et 42% des séquences hypermutées chez des patients en PHI et au stade SIDA respectivement). 99% des séquences hypermutées contiennent des codons stop (Janini et al. 2001).

Hiener et ses collègues ont séquencé le génome complet chez 6 patients (50% des patients ont été traités durant la PHI) par la technique NGS. Sur 531 séquences obtenues, 9% des séquences étaient hypermutées et comportaient des codons stop. Une différence significative du taux des hypermutations et des codons stop selon la phase de la maladie a été décrite. Les

séquences des patients traités pendant la PHI étaient hypermutées à 15,8% contre seulement 2,6% chez les patients traités pendant la phase chronique de l'infection (Hiener et al. 2017). Ces résultats sont concordants avec ceux trouvés par Bruner et ses collaborateurs. L'analyse de 141 séquences de 8 patients traités rapidement a montré que 16 % de ces séquences sont hypermutées. En revanche, l'analyse de 152 séquences de 10 patients traités pendant la phase chronique de l'infection a révélé que les séquences hypermutées ne représente que 7%. Ces taux d'hypermutations très différents en fonction de la phase de la maladie peuvent être expliqués par la stimulation et l'augmentation de l'activité des APOBEC3 par les INF de type I pendant les phases précoces de l'infection (Bruner et al. 2016).

Ces résultats sont contradictoires avec ceux d'une étude récente montrant l'absence des hypermutations chez des patients traités durant la PHI (Lee et al. 2019). Lee et ses collaborateurs ont analysé les séquences du génome viral chez 4 femmes diagnostiquées durant les phases très précoces de l'infection (2 et 2 patientes aux stades Fiebig II et V, respectivement). Le provirus intact varie de 82% à 100% et de 15 à 35% aux stades Fiebig II et V respectivement. Au cours du stade Fiebig II aucune séquence hypermutée n'est retrouvée, cependant 6% des séquences étaient hypermutées au cours du stade Fiebig V (Lee et al. 2019).

8 Stratégies thérapeutiques de guérison de l'infection VIH

L'établissement du réservoir latent au cours des phases très précoces de l'infection, la multiplicité des sites anatomiques réservoirs, l'absence de marqueurs spécifiques des cellules infectées ainsi que la persistance de ce réservoir malgré une thérapie antirétrovirale efficace constituent un obstacle majeur à l'éradication de la maladie (Castro-Gonzalez, Colomer-Lluch, et Serra-Moreno 2018; Bailon et al. 2020).

Plusieurs études récentes de guérison ou de « cure fonctionnelle » se sont focalisées sur l'élimination et le contrôle de ce réservoir latent du VIH (Maina et al. 2021; Pitman et al. 2018; Rodríguez-Muñoz et Moreno 2019; Cohn, Chomont, et Deeks 2020; Sadowski et Hashemi 2019; Moranguinho et Valente 2020). Les principales stratégies dites d'éradication

du VIH sont « Shock and Kill », « Block and Lock », la transplantation de cellules souches hématopoïétiques (CSH), la thérapie génique et la vaccination thérapeutique.

La stratégie « **Shock and Kill** » est la plus étudiée, elle a pour but de réduire la taille du réservoir latent. Les essais de cette stratégie se basent sur la réactivation des cellules latentes avec des agents suppresseurs de la latence « Latency Reversing Agent : LRA ») tels que le Vorinostat, le Panobinostat, le Romidepsin, le Disulfiram, etc) suivie de l'élimination de ces cellules exprimant les protéines virales par effet cytopathique ou par activation immunitaire pendant que la thérapie antirétrovirale empêche l'infection de nouvelles cellules (Trautmann 2016; Darcis, Van Driessche, et Van Lint 2016; Maina et al. 2021). Les LRA diffèrent par leur mode d'action et leurs cibles. Ils peuvent agir comme modulateurs de chromatine, activateurs ou contrôleurs du processus de la transcription cellulaire (Spivak et Planelles 2018). Une efficacité sur la réactivation sur la diminution du réservoir viral et certains LRA avaient une toxicité cellulaire (Abner et Jordan 2019; Y. Kim, Anderson, et Lewin 2018; Ait-Ammar et al. 2019). Ces données ont poussé les chercheurs à mieux optimiser cette stratégie et à tester l'utilisation de combinaisons de différentes classes de LRA non toxiques (Maina et al. 2021).

Contrairement aux essais de « Shock and Kill », la stratégie « **Block and Lock** » n'a pas pour but d'éliminer le réservoir latent mais de bloquer de façon définitive la latence virale et d'empêcher la réactivation cellulaire. Le contrôle de l'infection serait donc possible même sans thérapie antirétrovirale. Plusieurs molécules telles que les siRNAs, la Didehydrocortistatin A, la Sudemycin D6, etc ont été testées afin de cibler des régions conservées du génome du virus, provoquant le blocage des gènes de réactivation et mettant en « sourdine » la transcription des provirus (Bobbin, Burnett, et Rossi 2015; Moranguinho et Valente 2020; Vansant et al. 2020). Les premiers résultats disponibles concernent des approches in vitro sur lignées cellulaires dans lesquelles l'intégration virale est modifiée ou bien la réplication est bloquée (Vranckx et al. 2016; Méndez et al. 2018). La transplantation des CSH est une autre stratégie qui a été déjà utilisée pour la guérison de l'infection à VIH. Cette stratégie se base sur la greffe de CSH provenant d'un donneur sain porteur d'une mutation génétique sur le co-récepteur CCR5 : CCR5 Δ 32/ Δ 32. Cette mutation confère une résistance à l'infection par le VIH à tropisme CCR5 (Lopalco 2010). Deux patients dans le monde ont bénéficié de cette stratégie réussie : un patient anglais connu sous le nom de « patient de Londres » et un autre patient allemand connu sous le nom de « patient Berlin ».

Le patient Berlin a bénéficié de deux transplantations de CSH d'un donneur homozygote CCR5 Δ 32 pour le traitement de sa leucémie myéloïde aigue avec une irradiation corporelle totale. Ce patient est resté 11 ans sans rebond virologique et en absence de traitement anti-VIH. Les tests de mesure du réservoir viral aussi bien moléculaires que fonctionnels sont négatifs dans tous les prélèvements (sang, LCR, tissus) et l'infection par le VIH est considérée éradiquée (Hütter et al. 2009; Lederman et Pike 2017).

Le patient de Londres a bénéficié d'une allogreffe avec un donneur homozygote CCR5 Δ 32, sans irradiation corporelle afin de traiter son lymphome de Hodgkin. Le nadir de CD4 était de 290 cellules/mm³ et la CVp initiale avant traitement était à 180 000 copies/ml. Six mois après l'allogreffe, une rémission complète a été observée. Les ARTs ont été suspendus au bout de 17 mois après l'allogreffe. Les cellules T CD4+ post-greffe n'exprimaient plus de CCR5 et n'étaient plus sensibles in vitro au virus à tropisme R5 (Ravindra K. Gupta et al. 2019; Ravindra Kumar Gupta et al. 2020).

Les résultats de cette stratégie sont très encourageants dans la lutte contre l'infection à VIH et l'éradication totale de cette maladie ; en revanche, le nombre de personnes dans le monde porteur de la mutations CCR5 Δ 32 est très faible ne dépassant pas les 1% limitant ainsi les possibilités de transplantation (L. Wu et al. 1997), de plus c'est une stratégie qui est très lourde, réservée à de rares situations cliniques ce qui complique son utilisation dans de larges étude de cure du VIH.

De nouvelles approches thérapeutiques en **thérapie génique** sont développées pour cibler le récepteur CCR5 et obtenir des cellules capables de résister à l'infection. Ces études se basent sur la modification génétique des CSH ou des LT CD4+ par des nucléases ou par de nouveaux outils d'édition des gènes récemment développés comme les Transcription activator-like

effector nucleases (TALENs) et le CRISPR associated protein 9 (CRISPR-Cas9) (Ebina et al. 2013). Ces nouveaux outils sont faciles à utiliser, cependant il existe toujours le risque de modifications génétiques (insertions, des mutations ponctuelles...) en dehors de la cible ce qui est à l'origine de l'interdiction de ces outils chez les êtres humains (Kang et al. 2015; Jilg et Li 2019; Qi et al. 2020).

Les vaccins thérapeutiques peuvent être considérés comme une stratégie d'éradication du virus latent. L'objectif de cette stratégie est de stimuler les réponses immunitaires cytotoxiques (spécifiquement par les CTL) et celles humorales afin d'éliminer les cellules infectées réactivées. Différents types de vaccins ont été développées afin d'induire une forte réponse immunitaire : vaccins protéiques, vaccins ADN ou ARN et vaccin à base de cellules dendritiques autologues. A ce jour, aucun vaccin n'a montré une efficacité suffisante pour éliminer l'infection à VIH (Mothe et Brander 2018; F. García et al. 2011; Mylvaganam, Silvestri, et Amara 2015; Bailon et al. 2020).

L'**immunothérapie** à base des anticorps inhibiteurs des « immune checkpoints » et à base de « chimeric antigen receptor-modified T cells : CAR T cells » est une perspective très prometteuse dans le traitement du VIH.

Les inhibiteurs des « immune checkpoints » sont des anticorps anti-PD1, anti-PDL-1 et anti-CTLA4 qui augmentent les fonctions des LT CD4 et des CD8 spécifiques du VIH-1. Ces résultats ont été confirmés in vivo chez des macaques et dans des modèles de souris humanisées (Velu et al. 2015; Evans et al. 2018; Cook et Kim 2019). Un effet potentiel des anti-PD-1 sur les réservoirs du VIH est plausible : d'une part, les anti-PD-1 vont réactiver les LTCD4 réservoirs qui surexpriment les protéines PD-1 ce qui va conduire à la transcription du VIH et d'autre part, ils vont rétablir une fonctionnalité des LT CD8 spécifiques du VIH qui pourront éliminer les LTCD4 réservoirs activés (Chomont et al. 2009; Palmer et al. 2013; Fromentin et al. 2019).

Concernant les CAR T cells dont la première génération a été développée il y a plus de vingt ans, le manque de sensibilité et d'efficacité ont orienté les recherches sur de nouvelles constructions. Les CAR T cells de nouvelles générations contiennent le récepteur CD4, capable de reconnaitre la gp120 virale avec une très forte affinité pour le virus du VIH. Avec la découverte des anticorps neutralisants « broadly neutralizing antibodies : bNAbs », la combinaison des CAR T cells avec les bNAbs est considérée comme une stratégie potentielle de cure de l'infection VIH. Les bNAbs ciblent aussi la gp d'enveloppe du VIH. Ces anticorps retrouvés chez 20 % des patients infectés sont très puissants et ont un effet neutralisant anti-VIH important. Les premiers essais cliniques ont montré l'innocuité de cette immunothérapie, mais une faible efficacité in vivo a été rapportée. (Kuhlmann, Peterson, et Kiem 2018; Hale et al. 2017; Ali et al. 2016; Qi et al. 2020)

TRAVAUX PERSONNELS

1. Objectifs

La thérapie antirétrovirale a transformé l'infection par le virus du VIH-1, mortelle auparavant en une maladie chronique. Elle a un bénéfice incontestable dans le contrôle virologique de la maladie, la diminution de la taille du réservoir viral, la restauration des défenses immunitaires ainsi que l'amélioration de la qualité de vie des patients. Cependant, la constitution rapide du réservoir du VIH-1, notamment par l'intégration de l'ADN-VIH dans le génome des cellules infectées durant les phases précoces suivant la contamination constitue un obstacle majeur pour l'éradication de cette maladie. Sa persistance au niveau du sang périphérique et au niveau des sites sanctuaires à long terme est à l'origine du rebond virologique, de la réactivation et de la progression de l'infection suite à l'arrêt du traitement même initié durant la PHI.

Le développement de nouvelles approches thérapeutiques et de nouvelles stratégies de guérison de l'infection par le VIH-1 se base sur la caractérisation du réservoir viral et la compréhension de sa dynamique d'évolution durant les différentes phases de la maladie.

Plusieurs chercheurs ont étudié de façon quantitative le réservoir viral et sa cinétique d'évolution dans différentes situations cliniques (au cours de l'histoire naturelle de la maladie, sous ARTs, chez les HICs, etc). En revanche, peu d'études se sont intéressées à l'évolution qualitative de ce réservoir et son mécanisme de maintien à long terme malgré une thérapie antirétrovirale efficace.

La mise en évidence d'une virémie résiduelle chez certains patients contrôlés virologiquement suggérait qu'elle peut être un contributeur important au maintien du réservoir, en particulier dans les sites sanctuaires. Cette virémie résiduelle pourrait être causée par une réplication virale de bas niveau ou par une libération de particules virales suite à une prolifération clonale des cellules infectées latentes. La réponse à cette question de l'origine de la persistance du réservoir viral est primordiale afin de développer des ARTs plus efficaces avec une meilleure pénétration dans les tissus réservoirs pour y cibler la réplication virale continue ou afin de viser l'élimination des cellules infectées latentes pour parvenir à une guérison définitive du VIH-1.

Dans ce contexte, l'objectif de notre premier travail a été de caractériser le réservoir viral chez des patients diagnostiqués et traités rapidement durant les phases précoces de l'infection par le VIH-1. Nous nous sommes intéressés à l'étude de la diversité virale au niveau du sang périphérique chez ces patients traités en PHI et sous thérapie antirétrovirale efficace durant au moins cinq ans afin d'évaluer l'impact de l'initiation rapide du traitement sur le réservoir viral et sur l'évolution des différentes populations virales au cours du temps.

L'infection par le VIH-1 est généralisée dans tout l'organisme et la contribution des différents organes et tissus pour le maintien du réservoir viral est inégale. Ce phénomène dit « de compartimentation virale » consiste en la présence de différentes populations virales en fonction de la barrière anatomique, du microenvironnement local ou de la diffusion des ARTs. L'étude de la compartimentation peut se faire avec des analyses phylogénétiques ou par la comparaison des profils de mutations de résistance des différentes souches virales présentes dans les différents compartiments. Ces études peuvent aider à la compréhension de l'établissement du réservoir viral et peuvent contribuer à mieux optimiser et à développer de nouvelles stratégies d'éradication du virus.

Les études de compartimentation au niveau des LN, du GALT et des tissus génitaux sont contradictoires. Certaines études suggèrent une compartimentation au niveau de ces tissus, tandis que d'autres affirment l'absence d'arguments en faveur de la variabilité virale par rapport aux souches circulantes au niveau du plasma. La compartimentation entre le sang périphérique et le système nerveux central (SNC) a été démontrée et a été associée à des troubles neurodégénératifs. Une réplication virale in situ (au niveau du liquide céphalorachidien, LCR) a été mise en évidence malgré l'absence d'une virémie plasmatique. Des études ont mis en évidence une différence des profils de mutations de résistance sur le gène de la TI et de la PR entre les deux compartiments nerveux et sanguins. Le profil de mutations de résistance aux INSTIs, largement utilisés depuis leur commercialisation, n'a jamais été étudié au niveau du SNC.

Dans ce contexte, l'objectif de notre deuxième travail a été de comparer les profils des mutations de résistances aux INSTIs au niveau du sang périphérique et du LCR (marqueur du SNC) en présence ou en absence de thérapie antirétrovirale efficace.

Les facteurs de restriction de l'hôte constituent des défenses immunitaires naturelles contre l'infection par le VIH-1. Les APOBEC3 sont des FRC particulièrement étudiés dans la restriction du cycle de la réplication virale. Elles inhibent plusieurs phases de la multiplication du virus dont la TI et l'intégration du provirus dans le génome de la cellule hôte. Le marqueur principal de l'activité des APOBEC3 est la production de transitions (G) vers (A) et des codons stop au niveau de l'ADN viral. Un nombre important de mutations (G) vers (A) provoque des hypermutations au niveau du génome viral qui devient défectif et incapable de donner naissance à de nouveaux virons. Plusieurs études ont montré que ces génomes défectifs sont systématiquement détectés dès les premières phases de l'infection et chez des patients sous thérapie antirétrovirale à long terme. Une étude chez des patients traités et des patients virémiques a montré qu'un niveau élevé de génomes défectifs était corrélé avec une petite taille du réservoir viral suggérant que la mesure de la quantité des virus intacts et ceux défectifs pourrait être utilisée comme marqueur d'éradication de l'infection par le VIH-1. D'autres études ont montré que l'activité des APOBEC3 induit une variation des séquences du virus et conduit à la diversité virale qui pourrait être un obstacle pour les nouvelles stratégies de guérison de la maladie.

Dans le cadre de notre troisième travail et dans ce contexte de l'étude de l'impact des APOBEC3 sur l'ADN viral et afin d'approfondir nos connaissances sur le réservoir viral, nous avons recherché les facteurs virologiques et cliniques associés à l'activité des APOBEC3 chez des patients sous thérapie antirétrovirale efficace.

2. Résultats / Articles

2.1 Article 1

Absence d'évolution moléculaire du virus du VIH-1 chez des patients traités rapidement durant la primo-infection et en suppression virologique pendant au moins 5 ans.

Abdi, B., Nguyen, T., Brouillet, S., Desire, N., Sayon, S., Wirden, M., Jary, A., Achaz, G., Assoumou, L., Palich, R., Simon, A., Tubiana, R., Valantin, M.-A., Katlama, C., Calvez, V., Marcelin, A.-G., Soulie, C., 2020. **No HIV-1 molecular evolution on long-term antiretroviral therapy initiated during primary HIV-1 infection**. AIDS 34, 1745–1753.

Résumé de l'article 1

Contexte

La thérapie antirétrovirale efficace n'empêche pas l'intégration de l'ADN-VIH-1 dans le génome des cellules infectées, notamment au niveau des LT CD4 mémoires à longue demivie.

La formation rapide du réservoir du VIH-1 constitue un obstacle majeur contre la guérison de cette infection. Atteindre l'éradication des réservoirs viraux ou la guérison fonctionnelle nécessite au préalable de caractériser au mieux de façon quantitative et qualitative ces réservoirs.

Plusieurs études ont montré l'intérêt de l'initiation rapide des ARTs durant les phases précoces de l'infection afin de bloquer la formation du réservoir viral, limiter sa taille et contrecarrer le phénomène de compartimentation virale. Cependant, le mécanisme de la persistance de ce réservoir viral et son maintien malgré une thérapie antirétrovirale efficace reste controversé.

Certains chercheurs ont suggéré que la virémie résiduelle mise en évidence chez certains patients en suppression virologique est à l'origine de cette persistance du réservoir viral à long terme. Cette virémie résiduelle pourrait être causée par une réplication virale de bas niveau, surtout au niveau des sanctuaires, et ainsi par la libération continue de particules virales. En revanche, d'autres études ont montré l'absence de preuves de réplication virale sous ARTs et ont suggéré que le maintien du réservoir viral est dû à la prolifération clonale des LT CD4 infectés.

Objectifs

Notre objectif principal est d'étudier la diversité virale chez des patients diagnostiqués et traités rapidement au cours de la PHI et en suppression virologique stricte depuis au moins 5 ans afin de mieux caractériser les changements génétiques des différentes populations virales. Le but de cette étude est de conclure entre ces deux hypothèses du mécanisme du maintien et de la persistance du réservoir viral.

Matériels et Méthodes

Notre étude observationnelle rétrospective longitudinale a été menée à l'hôpital La Pitié Salpêtrière. Nous avons inclus 20 patients diagnostiqués au cours de la PHI dans les services des Maladies Infectieuses et Tropicales et de Médecine Interne. Les patients ont été traités rapidement au cours de la PHI avec une CVp indétectable (≤ 20 copies/mL) durant au moins 5 ans sans aucun rebond virologique.

Nous avons recueilli les données cliniques de la base des données NADIS des deux services cliniques. Toutes les analyses ont été faites de façon rétrospective sur des échantillons de plasma (ARN-VIH-1) et du culots globulaires (PBMC) à partir de prélèvements sanguins périphériques effectués dans le cadre du suivi standard des patients.

Nous avons quantifié la CV totale de l'ADN-VIH avec la technique commercialisée par Biocentric, Bandol, France (GENERIC HIV DNA Cell). Nous avons mis au point une technique d'amplification par PCR et de séquençage haut débit avec la technologie Illumina Miseq (Illumina, San Diego, Californie, États-Unis) afin de séquencer deux fragments du gène de la TI : RT1 et RT2 de 413 pb et de 446 pb respectivement et un fragment de la région C2V3 du gène de la gp 120 de 367 pb. Nous avons séquencé 3 échantillons pour chaque patient correspondant à son premier prélèvement de CVp avant le début des ARTs et deux prélèvements au niveau des PBMC (le premier quand la CVp est devenue indétectable et un deuxième correspondant à la fin de la période du suivi de 5 ans). Nous avons étudié la diversité virale au cours du temps avant et après la thérapie antirétrovirale efficace avec

l'étude longitudinale des profils des mutations de résistance sur le gène de la TI et avec une analyse phylogénétique plus fine sur le gène de la TI et de la région C2V3.

Pour l'étude des mutations de résistance, nous avons analysé les séquences avec la plateforme d'analyse des séquences haut débit IDNS® SmartGene 2019 se basant sur le dernier algorithme de résistance de l'ANRS-MIE. Les variants viraux présents à plus de 20 % des quasi-espèces étaient considérés comme majoritaires et ceux présents entre 2 et 20 % étaient considérés comme minoritaires.

Les arbres phylogénétiques ont été reconstruits par la méthode du maximum de vraisemblance avec 1000 itérations, en utilisant le logiciel Fastree 2,1. L'analyse de la diversité virale interindividuelle était recherchée sur la topologie de l'arbre et la diversité de nucléotides (Average Pairwise Distance, APD) entre les séquences a été calculé comme étant la moyenne de toutes les distances nucléotidiques par paire entre des lectures avec au moins 100 paires de bases chevauchantes en utilisant le logiciel MEGAX.

<u>Résultats</u>

Nous avons inclus 20 patients en suppression virologique stricte (sans aucun rebond virologique) pendant au moins 5 ans. 75% d'entre eux étaient symptomatiques au cours de la PHI. Les patients avaient 47 ans en médiane (IQR 34-53), 90% (18/20) étaient des hommes dont 75% (15/18) étaient des HSH. Le délai médian d'initiation des ARTs était de 5 jours (IQR 1-12). La médiane de la CVp au moment de la PHI était de 5,7 log₁₀ copies/ml (IQR : 4,94–6,26). La décroissance de la virémie plasmatique sous ARTs était rapide et une CVp indétectable a été atteinte rapidement, dans un délai médian de 95 jours (IQR 40-119). La virémie résiduelle (présence de signal compris entre 1 et 20 copies/ml) a été mise en évidence au moins une fois au cours des 5 ans de suivi chez 13 des 20 patients (65%). Les patients avaient un réservoir viral élevé en PHI estimé avec une CV ADN-VIH totale égale en médiane à 3,24 log₁₀ copies/10⁶ cellules (IQR 2,72–3,49). L'analyse longitudinale d'au moins 8 échantillons de PBMC par patients (158 échantillons au total) a montré que cette CV diminue au cours du suivi de façon significative (p=0,02) pour atteindre une médiane de 1,60 log₁₀ copies/10⁶ cellules (IQR : 1,60). A la fin du suivi, 70% (14/20) avaient une CV ADN-VIH indétectable.

Au moment de la PHI, 3 patients seulement avaient des DRAMs sur le gène de la TI (2 K103N et 1 Y188H). L'analyse longitudinale des DRAMs a montré l'apparition de nouvelles DRAMs chez 9 patients, malgré un contrôle virologique strict et l'absence de rebond virologique tout au long de la période de suivi. 4 et 7 patients ont acquis de nouvelles DRAMs au moment du premier point de l'indétectabilité et 5 ans après le suivi respectivement. 5 patients avaient au moins une mutation G vers A au cours du suivi.

Grâce à l'analyse phylogénétique, nous avons montré l'absence de la diversité virale chez ces patients diagnostiqués et traités rapidement au cours de la PHI. Les séquences des patients correspondantes aux trois prélèvements différents au cours du temps étaient entremêlées et homogènes. Nous avons mis en évidence en se basant sur la topologie des arbres phylogénétiques, l'absence de la ségrégation entre les séquences avant et après le traitement de l'infection. La comparaison des APD (variation stable de 1% à 2%) des séquences obtenues à partir d'échantillons prélevés à des moments différents au cours du suivi a montré l'absence d'arguments en faveur de l'évolution et de la diversité virale chez ces patients.

Conclusion

Nous avons confirmé avec notre étude l'intérêt de l'initiation rapide des ARTs au cours des phases les plus précoces de l'infection afin de supprimer la virémie plasmatique, de limiter la taille du réservoir et d'améliorer les défenses immunitaires de l'organisme. Nous avons montré pour la première fois l'absence de preuves significatives d'un changement ou d'une modification de la composition du réservoir viral chez des patients adultes traités rapidement au cours de la PHI et en suppression virologique au long cours. Notre conclusion d'absence d'évolution et de diversité virale chez ces patients pourrait aider à mieux optimiser les stratégies d'éradication du virus.

Article 1

No HIV-1 molecular evolution on long-term antiretroviral therapy initiated during primary HIV-1 infection

Basma Abdi^a, Thuy Nguyen^a, Sophie Brouillet^b, Nathalie Desire^a, Sophie Sayon^a, Marc Wirden^a, Aude Jary^a, Guillaume Achaz^b, Lambert Assoumou^c, Romain Palich^d, Anne Simon^e, Roland Tubiana^d, Marc-Antoine Valantin^d, Christine Katlama^d, Vincent Calvez^a, Anne-Geneviève Marcelin^a and Cathia Soulie^a

See related paper on page 1855

Objective: Most studies about HIV-1 molecular evolution have shown the lack of viral evolution on effective antiretroviral therapy (ART), although controversial results have been documented. We therefore aimed to look for evidence of HIV-1 evolution in patients who initiated ART at the time of primary HIV-1 infection (PHI).

Design: We included retrospectively 20 patients diagnosed at PHI, treated at the time of acute infection and with subsequent effective long-term suppressive ART (HIV viral load <20 copies/ml during at least 5 years without any blips).

Methods: Longitudinal blood samples were deep sequenced using Illumina Miseq. Drug-resistance-associated mutations were retained at 2% cutoff and interpreted using the latest Agence Nationale de Recherches sur le Sida et les Hépatites Virales resistance algorithm. Viral evolution was established when temporal structure on maximumlikelihood phylogenetic tree and significant change over time of HIV-1 genetic diversity measured as the average pairwise distance was observed.

Results: Emergences or disappearances of drug-resistance-associated mutations were detected in the blood cells during follow-up despite sustained virological control. In all patients, tree topologies showed an absence of segregation between sequences and blood viral populations from all time-points were intermingled. Comparison of the average pairwise distance showed the absence of significant viral diversity at the time of primary infection and afterwards during 5 years of full virological control under ART.

Conclusion: Despite a slight variation of minority resistance-associated mutation variants, there was no clear evidence of viral evolution during a prolonged period of time in this population of highly controlled adult patients treated at time of PHI. Copyright © 2020 Wolters Kluwer Health, Inc. All rights reserved.

AIDS 2020, 34:1745-1753

Keywords: evolution, HIV, primary infection, reservoir

^aSorbonne Université, INSERM, Institut Pierre Louis d'Epidémiologie et de Santé Publique (IPLESP UMRS 1136), AP-HP, Hôpital Pitié Salpêtrière, Laboratoire de Virologie, ^bInstitut de Systématique, Evolution, Biodiversité (ISYEB), Muséum national d'Histoire naturelle, CNRS Sorbonne Université, ^CSorbonne Université, INSERM, Institut Pierre Louis d'Epidémiologie et de Santé Publique (IPLESP UMRS 1136), ^dSorbonne Université, INSERM, Institut Pierre Louis d'Epidémiologie et de Santé Publique (IPLESP UMRS 1136), AP-HP, Hôpital Pitié Salpêtrière, Service des Maladies Infectieuses, and ^eSorbonne Université, INSERM, Institut Pierre Louis d'Epidémiologie et de Santé Publique (IPLESP UMRS 1136), AP-HP, Hôpital Pitié Salpêtrière, Service de Médecine Interne, Paris, France.

Correspondence to Dr Basma Abdi, Laboratoire de Virologie, CERVI, Hôpital Pitié Salpêtrière, 45–83 Bd de l'Hôpital, 75013 Paris, France.

Tel: +33 1 42 17 58 42; fax: +33 1 42 17 74 11; e-mail: basma.abdi@aphp.fr Received: 2 April 2020; revised: 25 May 2020; accepted: 7 June 2020.

DOI:10.1097/QAD.000000000002629

ISSN 0269-9370 Copyright © 2020 Wolters Kluwer Health, Inc. All rights reserved. Copyright © 2020 Wolters Kluwer Health, Inc. All rights reserved.

1745

Introduction

Primary HIV-1 infection (PHI) is the initial phase of infection. It represents the time when the virus is first disseminating throughout the body and induces host immune responses [1-3]. The HIV reservoir is established very rapidly during this stage, due to the provirus integrated into the genome of cells that enables the persistence and the establishment of a latent reservoir which remains the major obstacle to eliminate the virus [4].

Several studies have demonstrated that early antiretroviral therapy (ART) initiation can be particularly effective for long-term control of HIV-1 replication and it is associated with a faster decay of the latent reservoir, a restriction of its size and an optimal immune restoration [5-7]. While, large clinical trials demonstrated that the benefits of earlier treatment mentioned above were limited at these specific criteria because treatment interruption is usually followed by rapid viral rebound, $CD4^+$ T cells loss and increased risk of morbidity and mortality [8–11].

In case of clinical effective ART, residual viremia has been evidenced and could be caused by ongoing low-level virus replication or by release of viral particles and/or viral genome from infected cells [12]. Effectively, it has been suggested that persistent virus replication at low levels may be an important contributor to the maintenance of the reservoir particularly in lymphoid tissue sanctuary sites [13]. However, other studies suggest that there is no evidence of HIV replication on ART and the lack of genetic structure of HIV populations during ART argues against ongoing residual replication [13–15].

A better understanding of changes in HIV-1 population genetics with ART is necessary to conclude between these two hypotheses and then for designing and optimizing new eradication strategies. PHI is a particular situation where the low diversity of the transmitted viruses has been described and thus investigating patients who started ART during the earliest stages of their HIV infection provides an opportunity to detect evidence of viral evolution.

We aim to study HIV-1 diversity in patients diagnosed with a PHI, treated at the time of acute infection and with strict effective long-term suppressive ART.

Materials and methods

We analyzed HIV-1 genetic variation and divergence of viral populations over time in plasma samples (RNA) before ART initiation and in blood cell samples (DNA) during 5 years of viral suppression on ART.

Patients

We retrospectively studied 20 patients diagnosed during PHI in the Departments of Infectious Diseases and Internal Medicine at Pitié–Salpêtrière Hospital (Paris, France). PHI was defined as detectable plasma HIV–RNA and an incomplete HIV–1 western blot, irrespective of the ELISA result (positive or negative) and p24 antigenemia (positive or negative).

Patients received ART very early after infection and were identified with a strict viral suppression (HIV plasma RNA < 20 copies/ml without any blips) for at least 5 years afterward under ART. Analyses were performed retrospectively on frozen samples of whole blood taken during 5 years of standard follow-up.

Ethical considerations

The current retrospective study was conducted in accordance with Good Clinical Practices and the ethical principles of the Helsinki declaration, and following Agence Nationale de Recherches sur le Sida et les Hépatites Virales (ANRS) standard practices for clinical research. Patients had written consent that the remnant of their samples could be used for research purpose.

Total HIV-DNA quantification

Cell-associated HIV-1 DNA was quantified by ultrasensitive real-time PCR (Generic HIV-DNA assay, Biocentric, Bandol, France) as previously described [16].

HIV-RNA quantification and ultra-sensitive viral load

Plasma viral load (pVL) was quantified using the Cobas AmpliPrep/CobasTaqMan HIV-1 assay (Roche Diagnostics, Risch-Rotkreuz, Switzerland; lower detection limit of 20 copies/ml). Ultra-sensitive viral load in the range of 1–20 copies/ml was indicated qualitatively (presence or absence of detectable signal).

Ultra-deep-sequencing

RNA and DNA extraction, amplification and ultra-deep sequencing

HÍV RNÁ was extracted from 1 ml of plasma using easyMAG (bioMérieux Clinical Diagnostics, France) and HIV DNA was extracted from 400 ml of peripheral blood mononuclear cells (PBMC) using the MagnaPure LC DNA Isolation Kit from Roche according to the manufacturer's instructions.

Ultra-deep sequencing (UDS) was performed using Illumina Miseq technology (Illumina, San Diego, California, USA). We deep sequenced two fragments RT1 and RT2 of reverse transcriptase gene (413pb: 2618–3031 and 446pb: 2877–3323 relative to HXB2 genome, respectively) and C2V3 region of gp 120 gene (367pb: 7011–7378 relative to HXB2 genome). Details of primers and PCR procedures used for UDS are

described in Supplemental Data, http://links.lww.com/ QAD/B791.

Three samples were sequenced per patient: one RNA-HIV: plasma at baseline prior ART initiation, two HIV DNA associated with peripheral blood cells under effective ART: first point of pVL less than 20 copies/ ml and 5 years follow-up period. Library construction from purified PCR products (RT1, RT2 and C2V3 amplicons) and 2 × 300 bp Illumina Miseq paired-end sequencing Water performed at the Genotyping and Sequencing Platform, ICM Brain and Spine Institute (Paris, France). Sequences were demultiplexed automatically on the MiSeq platform as part of the data processing steps and two paired fastq files were generated for each sample representing the two paired-end reads.

HIV drug resistance testing by ultra-deep sequencing

To identify drug resistance associated mutations (DRAMs), the sequence reads were analyzed with IDNS[®] SmartGene 2019 (Advanced sequencing platform) and resistance (Cutoff detection of minority resistant variant of UDS sequences = 2%) was interpreted using the latest ANRS resistance algorithm (http://www.hivfrenchresistance.org). Variants present in more than 20% of the quasispecies were considered to be majority resistant variants and variants present at a proportion between 2 and 20% were considered to be minority variants.

Phylogenetic analysis

We used Geneious research software (version 11; Biomatters, Auckland, New Zealand) for phylogenetic analysis [17]. The paired-end reads are merged and quality-filtered to remove noise. Alignment is performed using a target-specific profile and a consensus is produced based on a user-selected ambiguity threshold. We used PhyML for maximum-likelihood phylogenetic reconstruction (Generalized time-reversible model). The best subtree pruning and regrafting and the nearest neighbor interchange heuristic options were selected. The reliability of tree topologies was assessed by bootstrapping using 1000 replications (values ≥70% were considered significant). Maximum-likelihood trees were rooted on an outgroup: HIV subtype B consensus (HxB2: K03455; www.hiv.lanl.gov). Tree figures were viewed and modified with FigTree software (http://tree.bio.ed.ac.uk/ software/figtree/).

Diversity analysis

To look for evidence of ongoing viral replication during ART, HIV populations in samples taken at baseline were compared with the populations present during and after long-term ART in reverse transcriptase and gp120 genes. Phylogenetic trees were constructed for each patient with sequences obtained from plasma at baseline prior ART initiation and HIV DNA associated with peripheral blood

cells under effective ART (first point of pVL < 20 copies/ ml and 5 years follow-up period). Population genetic diversity was calculated as average pairwise distance (APD) using MEGAX (http://www.megasoftware.net) [18].

Viral evolution was established when temporal structure on maximum-likelihood maximum-likelihood phylogenetic trees and significant change over time of HIV-1 genetic diversity (APD) were observed.

HIV-1 tropism

HIV-1 coreceptor usage was predicted by a genotypic method that used the Geno2phenoreceptor rule (https:// coreceptor.geno2pheno.org/) and according to ANRS rules (http://www.hivfrenchresistance.org/hiv-tropism.html).

Statistical analysis

All reported values are medians with interquartile range (IQR) for continuous variables and frequencies and percentages for categorical variables. Changes in cell associated HIV-DNA and CD4⁺ cell count were compared between baseline and month 60 using paired Wilcoxon test and the Mann-Whitney test was for comparison between participants with DRAMs dynamics and those with not. Univariable model was used to identify factors associated with DRAMs: age, sex, transmission group, duration of ART, baseline CD4⁺ and CD8⁺ cell counts, CD4⁺/CD8⁺ ratio, nadir CD4⁺ cell count, time since HIV diagnosis, duration of suppressed viremia, time to ART initiation, time to undetectable viral load under ART, duration of infection, pre-ART pVL, peak of pVL, baseline HIV cell-associated DNA, HIV-1 subtype, CD4⁺ cell count and HIV cellassociated DNA during follow-up.

All reported P values are two-tailed, with significance set at 0.05. Analyses were performed with SPSS statistics version 23.0 for Windows (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA).

Results

Patients' characteristics at time of primary HIV-1 infection

Twenty patients with strict viral suppression (HIV viral load <20 copies/ml without any blips) were included in the study with a median age of 47 years (IQR 34–53). Eighteen (90%) were male. Nine of the patients (45%) and 11 of 20 (55%) were diagnosed at Fiebig stages III and IV, respectively. Fifteen patients (75%) were symptomatic at time of PHI. Time to ART initiation, time to undetectable viral load under ART and duration of infection was in median 5 days (IQR 40–119) and 6 years (IQR 6–7), respectively. Of

1748 AIDS 2020, Vol 34 No 12

Table 1.	Patients'	characteristics a	t the	time of	primary	infection.
	0.000.0000.0000.000				. ,	

Characteristics	Total = 20
Age (years), median (IQR)	47 (34-53)
Sex, n (%)	
Male	18 (90%)
Female	2 (10%)
Origin, n (%)	
White	19 (95%)
Others	1 (5%)
Transmission group, n (%)	
MSM	15 (75%)5 (25%)
Heterosexual	
Symptomatic PHL n (%)	15 (75%)
HLA B57*01, n (%)	
Negative	10 (50%)
ND	10 (50%)
Fiebig stage	
III	9 (45%)
IV	11 (55%)
HIV-1 RNA Zenith (log10 copies/ml).	5.82(4.94 - 6.26)
median (IOR)	
HIV-1 RNA (log10 copies/ml), median	5.7(4.94 - 6.26)
(IOR)	
HIV DNA (log10 copies/10 ⁶ cells), median	3.24(2.72 - 3.49)
(IOR)	012 1 (211 2 0110)
CD4 ¹ nadir cell count (cells/ul) median	417 (325-522)
(IOR)	117 (525 522)
CD4 ⁺ cell count (cells/ul), median (IOR)	483 (325-566)
Duration of infection (years), median (IQR)	6 (6-7)
Time from diagnosis to ART initiation	5(1-12)
(days), median (IOR)	5 (1 12)
Time to undetectable viral load (days)	95(40-119)
median (IOR)	55 (10 115)
ART regimen n (%)	
$2 \text{ NPTI} \pm 2 \text{ PI}$	8 (40%)
2 NRTI ± 1 INI	8 (40%)
2 NRTI \pm 1 NNRTI	2 (10%)
2 NPTI \pm 2 PI \pm MVC	2 (1070)
	1 (5 %)
2 INTITION	1 (370)

ART, antiretroviral therapy; IQR, interquartile range; MVC, maraviroc; ND, not determined; NNRTI, nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor; NRTI, nucleoside reverse transcriptase inhibitor; PHI, primary HIV-1 infection; PI, protease inhibitor.

the 20 patients, 12 (60%) were infected with the clade B virus. Main characteristics of patients are summarized in Table 1.

Evolution of immulogical and virological parameters

Evolution of immunological and virological parameters is presented in Fig. 1. A median of 10 longitudinal plasma HIV-1 RNA was evaluated per patient (197 samples in total). The median HIV-RNA viral load at time of PHI was 5.7 log₁₀ copies/ml (IQR: 4.94–6.26) and decreased quickly with all patients reaching viral load less than 20 copies/ml in a median of 95 days (IQR: 40–119) of ART initiation. Ultrasensitive viral load (presence of detectable signal between 1 and 20 copies/ml) was found at least once during the 5 years follow-up in 13 of 20 patients (65%).

The total cell-associated HIV-1 DNA level was assayed for a median of eight longitudinal blood samples per participant (158 samples in total). The median HIV-1 DNA load at PHI and over 5 years of follow-up was 3.24 log₁₀ copies/ 10^6 cells (IQR: 2.72–3.49) and 1.60 log₁₀ copies/ 10^6 cells (IQR: 1.60), respectively. The analysis revealed a global and significant decrease in total HIV-1 DNA during follow-up period (P=0.02). The total cell-associated HIV-1 DNA load was not detectable (<40 copies/ 10^6 cells) for 14 (70%) patients at the end of follow-up.

Resistance analysis and tropism

At baseline, DRAMs were detected in reverse transcriptase gene in three (15%) patients with two majority resistant variants: two K103N (98%) and one minority resistant variant Y188H (2%). Regarding longitudinal dynamics of nucleoside reverse transcriptase inhibitor and nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor (NNRTI) DRAMs, DRAMs at baseline were compared with archived DRAMs during follow-up period (Table 2). New DRAMs were detected in nine patients (45%) despite fully sustained suppression of HIV-RNA in plasma with new archived DRAMs in 4/20 (25%) patients at the first point of pVL less than 20 copies/ml: patients 4, 5, 16 and 17. Seven (35%) individuals had at least one emerging DRAM in peripheral blood cells after 5 years of follow-up (most of them were detected at <10%): patients 3, 4, 9, 10, 11, 12 and 16 (Table 2). Fiftyfive percentage (5/9) of patients who showed emergence of DRAMs had one residual viremia at least once during follow-up. The comparison between the characteristics of patients with new archived DRAMs and those without revealing that only transmission group is associated with the dynamics of archived DRAMs. Effectively, all patients who had variants with new DRAMs were MSM (P = 0.02).

Five patients (25%) had at least one G-to-A mutation resistance associated mutation: patient 4: D67N (9.9%) and M184I (2.7%); patient 5: M230I (98.9%); patient 10: M184I (2.3%); patient 12: D67N (7.2%) and patient 16: D67N (4.4%), M184I (98%) and M230I (100%) (Table 2).

Fifteen patients (75%) harbored a CCR5-tropic virus. The genotypic prediction of C2V3 coreceptor tropism did not vary over time in all patients.

Search of potential HIV genetic evolution: phylogenetic studies

Phylogenetic analyses were processed in the 20 individuals, in reverse transcriptase and gp120 gene. Analysis showed that in all patients, sequences were intermingled: in each patient, sequences obtained from three different time points were highly homogenous. Tree topologies showed an absence of segregation between sequences in HIV-1 RNA at baseline prior to ART and in cellassociated HIV-DNA during 5 years of ART (Fig. 2).



Fig. 1. Median of longitudinal plasma HIV-1 RNA, cell associated HIV-1 DNA levels and CD4⁺ cells count in 20 patients. All available samples for 5 years in 20 patients are displayed; D0=day with confirmed diagnosis of primary HIV-1 infection; M = month; HIV-1 RNA (log₁₀ copies/ml); HIV-1 DNA (log₁₀ copies/10⁶ cells); CD4⁺ cells count (cells/µl).

The APD was estimated between the reads obtained from each time point. In the first sample (in HIV-RNA at baseline prior to ART), the median of APD was 1% (IQR: 1-1), 1% (IQR: 1-1) and 2% (IQR: 1-2) in RT1 fragment, RT2 fragment and gp120 gene, respectively. In the second sample (in cell associated HIV-DNA; first time point of plasma viral load <20 copies/ml) the median of APD was 1% (IQR: 1-2), 1% (IQR: 1-1) and 2% (IQR: 1-3.75), respectively in RT1 fragment, RT2 fragment and gp120. In the third sample (in cell associated HIV-DNA after 5 years of follow-up), the median of APD was 1% (IQR: 1-2), 1% (IQR: 1-1) and 2% (IQR: 1-2) in RT1 fragment, RT2 fragment and gp120 gene respectively. This comparison of the APD in sequences obtained from samples taken at different times showed the absence of arguments of significant viral diversity evolution

between primary infection and during the following 5 years.

Discussion

To our knowledge, it is the first study to report quantitative and qualitative analysis by UDS of HIV-1 reservoir in 20 patients diagnosed in the acute phase of infection, treated very early and had strict effective longterm suppressive ART (during at least 5 years of followup). There was a significant decay of HIV-RNA and cellassociated HIV DNA in our study in participants who started ART during the first month of their infection. Phylogenetic analysis showed the absence of genetic

1750 AIDS 2020, Vol 34 No 12

Table 2. Ultra-Deep Sequencing evolution of archived DRAMs in plasma (RNA) at baseline and cell-associated HIV-1 DNA (DNA) under effective ARTs: results in % (mutation frequency among all reads).

Patient	Time point	Ongoing ART	NRTI DRAMs (% quasispecies)	NNRTI DRAMs (% quasispecies)
3	RNA DNA*	TDF/FTC/DRV/RTV		Y188H (2.0%)
	DNA**	TDF/FTC/DTG	M41L (9.1%), T69S (13.6%), <u>L74V (6.0%)</u>	
4	RNA DNA* DNA ^{**}	ABC/3TC/RAL TDF/FTC/RPV	D67N (9.9%), K70R (2.4%), M1841 (2.7%), M184V (4.8%)	K103N (5,5%) <u>V90I (2,2%),</u> K103N (7,1%), <u>E138A</u>
<u>5</u>	RNA DNA* DNA**		M1041 (2,7 %), <u>M1047 (4,6 %)</u> M230I (98.9%)	(2,7 70)
<u>9</u>	RNA DNA* DNA**	TDF/FTC/DRV/RTV TDF/FTC/RPV	<u>M184V (8.8%)</u>	<u>Y188L (2%)</u>
<u>10</u>	RNA DNA* DNA ^{**}	TDF/FTC/DRV/RTV TDF/FTC/RPV	M184I (2.3%), <u>M184V</u>	G190V (2.1%)
11	RNA DNA* DNA**	TDF/FTC/MVC TDF/FTC/RPV TDF/FTC/DTG 3TC/DTG	112707	<u>V1791 (10.2%),</u> V179D (2.3%)
<u>12</u>	RNA DNA*	TDF/FTC/RAL		
	DNA**	TAF/FTC/EVG/COB	M41L (3.2%), D67N (7.2%)	K103N (7.9%)
<u>16</u>	RNA DNA* DNA ^{**}	TDF/FTC/RAL TDF/FTC/RPV 3TC/DTG	D67N (4.4%), M184I (98.0%), M184V (2.0%)	E138A (45.4%) M230I (100.0%)
17	RNA DNA*	TDF/FTC/DRV/RTV/MVC	M41L (7.8%), <u>T69N (3.7%),</u>	K103N (11.6%)
	DNA**	TDF/FTC/DRV/RTV TDF/FTC/EFV	<u>T69S (4.9%)</u>	

3TC, lamivudine; ABC, abacavir; COB, cobicistat; DNA^{*}, first point of plasma VL < 20 copies/mL, DNA^{**}, 5 years follow-up period; DRV/RTV, darunavir/ritonavir; DTG, dolutegravir, EVG, elvitégravir; EFV, efavirenz; FTC, emtricitabine; MVC, maraviroc; RAL, raltegravir; RPV, rilpivirine; TDF, tenofovir disoproxil fumarate; UDS, Ultra-Deep Sequencing. Underlined: mutations associated with prescribed treatment; Italic: mutations not related with prescribed treatment. Bold: G1-O-A mutations; Bold and Underlined: patients with at least 1 residual vireamia during follow up. DNA^{*}: first point of plasma viral load less than 20 copies/ml. DNA^b: 5 years of follow-up period.

divergence and diversity in the reverse transcriptase and gp120 genes over time. However, despite sustained virological control under ART, some minor variations (emergence or disappearance) of DRAMS were evidenced associated or not with the current antiretroviral treatment.

Our results are in line with a number of studies showing the faster decrease of HIV DNA in patients starting ART during acute HIV-1 [19–21] infection. However, some clinical trials evidenced a viral rebound after prolonged virologic suppression with no difference in virological and immunological parameters between immediate and delayed treatment in the vast majority of cases [8–11,22]. In this study, 15% of NNRTI DRAMs (two K103N and one Y188H) were revealed at the time of primary HIV infection. This prevalence is similar to the latest data (2014–2016) from the French cohort of primary infections showing that 18.6% of patients had DRAMS at baseline with the highest level of resistance to the NNRTI class (13.4%) [23].

Concerning longitudinal dynamics of minority variants, new DRAMs, not detected at baseline, appeared during follow-up in some patients treated early during the acute phase of HIV-1 infection despite a fully controlled vireamia less than 20 copies/ml and absence of detected residual viremia in 45% (4/9) of cases. This finding is

Viral diversity in primary HIV infection Abdi et al. 1751



Fig. 2. Example of phylogenetic tree for patient 18 constructed from HIV-RNA at baseline prior antiretroviral therapy initiation and HIV-DNA associated with peripheral blood sequences. We used PhyML for maximum-likelihood phylogenetic reconstruction (generalized time-reverse model); maximum-likelihood tree was rooted on an outgroup: HIV subtype B consensus (HxB2: K03455); phylogenetic tree showing intermingled sequences in reverse transcriptase gene.

consistent with the assessments carried out by Gantner *et al.* [24] they used the UDS technique to assess the longitudinal dynamics of viral resistant quasispecies archived in blood and demonstrated that, despite virological control, the diversity of the quasispecies continued to evolve. This could be the result of persistence of a residual viremia below the limit of standard quantification in some patients. Other researchers suggested that the new variants have most probably been selected directly in the blood compartment or other reservoirs because of insufficient drug penetration [24–

26]. In addition, some of these new DRAMs in blood cells were G-to-A mutations implicating APOBEC3 editing, a cellular enzyme action and not viral replication [27].

The results of phylogenetic analysis, as well phylogenetic tree and APD, suggested the absence of genetic changes in archived HIV-1 DNA in our patients treated during the acute phase of infection with effective ART. Our findings support the majority of the studies reporting the lack of viral evolution during suppressive ART in chronically

1752 AIDS 2020, Vol 34 No 12

HIV infected adults, as well as in children treated shortly after birth when viral diversity is low [14,15,28]. This absence of sequence divergence is indicative of long-lived cells infected and argues against viral replication being the major source of persistent viremia [14,15,28-30]. On another side, Lorenzo-Redondo et al. [13] reported that anatomical sanctuary sites such as the lymph nodes can allow residual viral replication on ART, contributing to the maintenance of the HIV reservoir. These findings were strongly criticized by Kearney et al. [29] who reanalyzed data and reported limits of data according to the low number of samples, the short time of the survey and absence of evidence of viral evolution using more complex analyses. There are several reasons to explain controversy results such as differences in study populations (children treated shortly after birth, adults with chronic infection, patients diagnosed in acute phase of infection), in sampling (plasma, cell associated HIV-DNA, lymph nodes), in sequencing (Sanger sequencing, Single Genome Sequencing, UDS: 454 Roche and Illumina technology) and in analysis (phylogenetic analysis, measure of the APD, test of panmixia and others mathematics methods...) [13-15,28-30,31].

Phylogenetic analysis allowed the comparison of the integrality of sequences which is more informative about viral diversity than the study of few resistance positions in the reverse transcriptase sequence. Then, the impact of rare resistant variants could be diluted and doesn't impact phylogenetic analysis and could explain the apparent discrepancy between the DRAMs variation and the stability in phylogenetic analysis in our study.

Conclusion

In conclusion, this study is the first to use the UDS technique to assess the longitudinal dynamics of viral populations in plasma prior to ART and in archived blood cells in sustained ART in patients diagnosed with a PHI and treated very early. Despite a slight variation of minority resistance-associated mutation variants, there was no clear evidence of viral evolution during a prolonged period of time. Our results underlined that ART initiation during PHI is fundamental to positively impact quantitative and qualitative biological parameters related to the HIV-1 reservoir to reduce its size and to control the viral diversity in the perspective to design of HIV-1 cure strategies.

Acknowledgements

The genotyping and sequencing platform, ICM Brain and Spine Institute (Paris, France)

Transparency declaration: all other authors: none to declare.

Authors contribution: B.A., C.S., A.G.M., V.C. designed the study; R.P., A.S., R.T., M.A.V., C.K. provided medical care to the participants and collected clinical data; B.A., T.N., S.S. collected biological data and performed experiments; B.A., T.N., N.D., S.B., G.A., L.A., analyzed results; B.A., C.S. wrote the article. All authors reviewed and accepted the final version of the article.

Conflicts of interest

There are no conflicts of interest.

References

- Kassutto S, Rosenberg ES. **Primary HIV type 1 Infection.** *Clin Infect Dis* 2004; **38**:1447–1453. Volberding P, Demeter L, Bosch RJ, Aga E, Pettinelli C, Hirsch 1.
- 3.
- Volberding P, Demeter L, Bosch RJ, Aga E, Pettinelli C, Hirsch M, et al. Antiretroviral therapy in acute and recent HIV infec-tion: a prospective multicenter stratified trial of intentionally interrupted treatment. AIDS 2009; 23:1987. Fiebig EVV, Wright DJ, Rawal BD, Garrett PE, Schumacher RT, Peddada L, et al. Dynamics of HIV viremia and antibody ser-oconversion in plasma donors: implications for diagnosis and staging of primary HIV infection. AIDS 2003; 17:1871–1879. Bacchus C, Cheret A, Avettand-Fenoël V, Nembot G, Melard A, Blanc C, et al. A single HIV-1 cluster and a skewed immune homeostasis drive the early spread of HIV among resting CD4+ cell subsets within one month post-infection. PLoS One 2013; 8:e64219. 4. 8:e64219. Strain MC, Little SJ, Daar ES, Havlir DV, Gunthard HF, Lam RY,

- Bre64219.
 Strain MC, Little SJ, Daar ES, Havlir DV, Gunthard HF, Lam RY, et al. Effect of treatment, during primary infection, on establishment and clearance of cellular reservoirs of HIV-1. *J Infect Dis* 2005; 191:1410–1418.
 Hocqueloux L, Avettand-Fènoël V, Jacquot S, Prazuck T, Legac E, Mélard A, et al. Long-term antiretroviral therapy initiated during primary HIV-1 infection is key to achieving both low HIV reservoirs and normal T cell counts. *J Antimicrob Chemother* 2013; 68:1169–1178.
 Schmid A, Gianella S, von Wyl V, Metzner KJ, Scherrer AU, Niederöst B, et al. Profound depletion of HIV-1 transcription in patients initiating antiretroviral therapy during acute infection. *PLoS One* 2010; 5:e13310.
 Hamlyn E, Ewings FM, Porter K, Cooper DA, Tambussi G, Schechter M, et al. Plasma HIV viral rebound following protocol-indicated cessation of ARI commenced in primary and chronic HIV infection. *PLoS One* 2012; 7:e43754.
 Grijsen ML, Steingrover R, Wit FWNM, Jurriaans S, Verbon A, Brinkman K, et al. N treatment versus 24 or 60 weeks of antiretroviral treatment during primary HIV infection: the randomized Primo-SHM trial. *PLoS Mee* 2012; 9:e1001196.
 Pantazis N, Touloumi G, Meyer L, Olson A, Costagliola D, Kelleher AD, et al. The impact of transient combination antiretroviral supression and immunologic response in later treatment. *AIDS* 2016; 30:637–888. 10.
- and immunologic response in later treatment. *AlbS* 2016; 30:879–888. Fidler S, Olson AD, Bucher HC, Fox J, Thornhill J, Morrison C, *et al.* Virological blips and predictors of post treatment viral control after stopping ARI started in primary HU infection. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2017; 74:126–133. Chaillon A, Gianella S, Lada SM, Perez-Santiago J, Jordan P, Ignacio C, *et al.* Size, composition, and evolution of HIV DNA populations during early antiretroviral therapy and intensifica-tion with maraviroc. *J Virol* 2018; 92:doi:10.1128/JVI.01589-17. Lorenzo-Redondo R, Fryer HR, Bedford T, Kim E-Y, Archer J, Pond SLK, *et al.* Persistent HIV-1 replication maintains the tissue reservoir during therapy. *Nature* 2016; 530:51–56. van Zyl G, Bale MJ, Kearney MF. HIV evolution and diversity in ARI-treated patients. *Retrovirology* 2018; 15:14. Kearney MF, Spindler J, Shao W, Yu S, Anderson EM, O'Shea A, *et al.* Lack of detectable HIV-1 molecular evolution during suppressive antiretroviral therapy. *PLoS Pathog* 2014; **10**:e1004010. 11.
- 12
- 13.
- 14. 15.

Viral diversity in primary HIV infection Abdi et al. 1753

- 16.
- 17.
- 18.
- 19
- 20.
- Avettand-Fènoël V, Chaix M-L, Blanche S, Burgard M, Floch C, Toure K, et al. LTR real-time PCR for HIV-1 DNA quantitation in blood cells for early diagnosis in infants born to seropositive mothers treated in HAART area (ANRS CO 01). *J Med Virol* 2009; 81:217–223. Kearse M, Moir R, Wilson A, Stones-Havas S, Cheung M, Sturrock S, et al. Geneious basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics* 2012; 28:1647–1649. Tamura K, Nei M. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Mol Biol Evol* 1993; 10:512–526. Chéret A, Bacchu-Souffan C, Avetland-Fenoël V, Mélard A, Nembot G, Blanc C, et al. Combined ART started during acute HIV infection protects central memory CD4+ T cells and can induce remission. *J Antimicrob Chemother* 2015; 70:2108–2120. Chéret A, Durier C, Mélard A, Ploquin M, Heitzmann J, Lécuroux C, et al. Impact of early CART on HIV blood and semen compartments at the time of primary infection. *PLoS One* 2017; 12:e0180191. Leite TF, Delatorre E, Côrtes FH, Ferreira ACG, Cardoso SW, Grinsztejn B, et al. Reduction of HIV-1 reservoir size and diversity after 1 year of cART among Brazilian individuals starting treatment during early stages of acute infection. *Front Microbiol* 2019; 10:145. Pantazis N, Touloumi G, Vanhems P, Gill J, Bucher HC, Porter K, et al. The effect of antiretroviral treatment of different durations in primary HIV infection. *AIDS* 2008; 22:2441–2450. Visseaux B, Assournou L, Mahjoub N, Grude M, Trabaud M-A, Raymond S, et al. Surveillance of HIV-1 primary infections in France from 2014 to 2016: toward stable resistance, but higher diversity. clustering and virulence? *J Antimicrob Chemother* 2020; 75:183–193. 21.
- 22.
- 23.

- Gantner P, Morand-Joubert L, Sueur C, Raffi F, Fagard C, Lascoux-Combe C, et al. Drug resistance and tropism as mar-kers of the dynamics of HIV-1 DNA quasispecies in blood cells 24.
- 25.
- 26.
- 27.
- 28.
- 29.
- Lascoux-Combe C, et al. Drug resistance and tropism as mar-kers of the dynamics of HIV-1 DNA quasispecies in blood cells of heavily pretreated patients who achieved sustained virolo-gical suppression. / Antimicrob Chemother 2016; 71:751–761. 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 U S A* 2008; 105:3879–3884. Doyle T, Smith C, Vitiello P, Cambiano V, Johnson M, Owen A, et al. Plasma HIV-1 RNA detection below 50 copies/ml and risk of virologic rebound in patients receiving highly active anti-retroviral therapy. *Clin Infect Dis* 2012; 54:724–732. Fourati S, Lambert-Niclot S, Soulie C, Wirden M, Malet I, Valantin MA, et al. Differential impact of APOBEC3-driven mutagenesis on HIV evolution in diverse anatomical compart-ments. *AlDS* 2014; 28:487–491. Van Zyl GU, Katusiime MG, Wiegand A, McManus WR, Bale MJ, Halvas EK, et al. No evidence of HIV replication in children on antiretroviral therapy. *J Clin Invest* 2017; 127:3827–3834. Kearney MF, Wiegand A, Shao W, McManus WR, Bale MJ, Lukes et al. Ongoing HIV replication during ART reconsidered. *Open Forum Infect Dis* 2017; 4:ok173. Kearney MF, Wiegand A, Shao W, Coffin JM, Mellors JW, Lederman M, et al. Origin of rebound plasma HIV includes cells with identical proviruses that are transcriptionally active before stopping of antiretroviral therapy. *J Virol* 2016; 90:1369–1376. 30.
- 90:1309–1376. Achaz G, Palmer S, Kearney M, Maldarelli F, Mellors JW, Coffin JN, et al. A robust measure of HIV-1 population turnover within chronically infected individuals. Mol Biol Evol 2004; 21,1003 1004 31. 21:1902-1912.

Supplemental Data

We deep sequenced RT gene into 2 fragments: RT1 (413pb), RT2 (446pb) and gp120 gene (367pb). These genes were amplified using two rounds of PCR amplification.

Details of primers used for amplification are listed in table 1.

PCR1 Forward (for) and PCR1 Reverse (rev) for PCR round one, and PCR 2 for and PCR2 rev for PCR round 2 (nested PCR). To amplify RT1 and RT2 fragments, the following thermocycler parameters were used for PCR1: 50 °C for 30 minutes (mn), 94 °C for 7 mn, 94 °C for 10 seconds (s), 55 °C for 30s, 68 °C for 1 mn, 35 cycles of steps 3–5 and 68 °C for 7 mn. We used a touchdown PCR for round 2 with the following parameters: 98 °C for 1 mn, 3cycles (98°C for 10s; 66-64 °C for 30s; 72°C for 15s), 3cycles (98°C for 10s; 64-62 °C for 30s; 72°C for 15s), 3cycles (98°C for 15s), 30 cycles (98°C for 10s; 60 °C for 30s; 72°C for 15s), and 72 °C for 7 mn.

To amplify ENV C2V3 region, the following thermocycler parameters were used for PCR1: 50 °C for 30 minutes (mn), 94 °C for 7 mn, 94 °C for 10 seconds (s), 53 °C for 30s,

68 °C for 1 mn, 35 cycles of steps 3–5 and 68 °C for 7 mn. Parameters used for PCR2 were: 98 °C for 1 mn, 98°C for 10s, 60 °C for 30s; 72°C for 15s, 40 cycles of steps 2-4 and 72 °C for 7 mn.

Primer Name	Primer Sequence (5'-3' orientation)
RT1-PCR1-for	TAGTCCTATTGARACTGTACCAGT
RT1-PCR1-rev	ATCCTACATACAARTCATCCATG
RT1- PCR2-for	ATGGCCATTGACAGAAGAAA
RT1- PCR2-rev	TGGAATATTGCTGGTGATCC
RT2- PCR1-for	GGGARGTYAATTAGGAATACC
RT2- PCR1-rev	AGTCTTTTGATGGGTCATAATA
RT2- PCR2-for	GATGTGGGkGATGCATATTT
RT2- PCR2-rev	CTGTATGTCATTGACAGTCCAG
V3- PCR1-for	CAG TAC AAT GTA CAC ATG G
V3- PCR1-rev	ATG GGA GGG GCA TAC ATT G
V3- PCR2-for	TTACAGTAGAAAAAT TCC CCT C
V3- PCR2-rev	AAT GGC AGTCTA GCAGAA G

Table 1 : Primers used for Ultra Deep Sequencing

for=forward; rev=reverse

2.2 Article 2

Article 2 : Absence de divergence significative des mutations de résistances des inhibiteurs de l'intégrase entre le sang périphérique et le liquide céphalorachidien.

Abdi, B., Chebbi, M., Wirden, M., Teyssou, E., Sayon, S., Palich, R., Seang, S., Valantin, M.-A., Simon, A., Tubiana, R., Katlama, C., Calvez, V., Marcelin, A.-G., Soulie, C., 2021. No difference in HIV-1 integrase inhibitor resistance between CSF and blood compartments. J Antimicrob Chemother. 76, 1553–1557

Résumé de l'article

Contexte

La compartimentation du VIH-1 est le reflet d'une évolution indépendante du virus au niveau des différents organes de l'organisme. Ce phénomène se traduit par la diversité génétique des différentes sous-populations virales en fonction de la présence de barrières anatomiques et du microenvironnement local incluant différents types de tissus et de cellules, impliqués dans la propagation de l'infection dans l'ensemble de l'organisme. Le neurotropisme du VIH-1 a été largement étudié suite à l'apparition de plusieurs troubles et pathologies neurologiques liés à l'infection par le VIH-1. Une réplication virale au niveau du LCR, en absence de virémie plasmatique a été démontrée. Sous une pression de sélection immune et en fonction de la capacité de pénétration des ARTs, certains variants viraux peuvent aussi apparaître au niveau du LCR.

La mise en évidence d'une compartimentation au niveau du SNC repose sur différents tests basés sur l'analyse phylogénétique des séquences des populations virales et la comparaison des topologies des arbres phylogénétiques au niveau du LCR et du sang ou la mise en évidence de populations virales au niveau central présentant un profil de mutations de résistance différent de celui des populations au niveau périphérique. Certaines études ont montré une légère différence des mutations de résistance sur le gène de la TI et de la PR entre les deux compartiments nerveux et sanguins. Cependant, les mutations de résistance associées aux INSTIs, largement utilisés selon les recommandations mondiales, n'ont jamais été étudiées dans ce contexte.

Objectif

L'objectif de notre étude est la description des mutations de résistances aux INSTIs au niveau du LCR, reflet du SNC, ainsi que la comparaison des profils de résistance et la topologie des arbres phylogénétiques des séquences obtenues dans le LCR et le sang périphérique.

Matériels et Méthodes

Notre étude observationnelle rétrospective longitudinale a été menée à l'hôpital La Pitié Salpêtrière. Nous avons inclus tous les patients séropositifs ayant bénéficié dans le cadre de la routine hospitalière d'une ponction lombaire entre 2008 et 2020 afin de rechercher l'étiologie de leurs troubles cognitifs sévères. Nous avons recueilli toutes les données cliniques de la base des données NADIS®. Nous avons recueilli de notre base de données SmartGene®, les différentes séquences au niveau du LCR et du plasma, obtenues par la technique du séquençage standard Sanger. Les mutations de résistance aux INSTIs ont été interprétées l'ANRS-MIE selon le dernier algorithme de disponible sur le site http://www.hivfrenchresistance.org et selon le dernier algorithme de l'Université de Stanford (the Stanford University drug resistance database). Concernant l'analyse phylogénétique, nous avons aligné les séquences avec le logiciel SeaView et nous avons reconstruit les arbres phylogénétiques par la méthode du maximum de vraisemblance avec 500 itérations afin de garantir leurs robustesses. Nous avons visualisé et modifié les arbres obtenus par le logiciel FigTree.

<u>Résultats</u>

Nous avons inclus 59 patients dont l'âge médian est de 44 ans (IQR 36-52) et 59,3% étaient des hommes. 32 patients étaient sous ARTs et 27 étaient non traités dont 21 patients étaient naïfs de traitement. Parmi les patients traités, 22/32 ont reçu un traitement contenant un INSTI. La médiane de la CVp des patients virémiques était de 5,32 log₁₀ copies/mL (IQR 3,85-5,80) vs 3,59 log₁₀ copies/mL (IQR 2,16–4,50) chez les patients traités. La médiane de la CV au niveau du LCR était plus élevée chez les patients non traités (4,79 log₁₀ copies/mL (IQR 3,56–5,25)) que chez ceux traités (3,80 log₁₀ copies/mL (IQR 2,68–4,33)).

Selon l'algorithme de l'ANRS, la résistance aux INSTIs était évaluée à 11,8% et de 13,5% dans le LCR et le plasma, respectivement. Les mutations de résistance aux INSTIs ont été détectées chez 9 (33,3%) des patients virémiques au niveau des deux compartiments : L74I (n=3) ; L74I/M (n=1) ; T97A (n=1) ; et E157Q (n= 4). 8/32 des patients traités avaient des mutations de résistance identiques au niveau du LCR et du plasma : L74I (n=6) ; L74M (n=1) ; T97A (n=1) ; et N155H (n=1). Un seul patient avait un profil de résistance différent entre ces deux compartiments avec une E138K associée au L74I présente seulement au niveau plasmatique. L'analyse phylogénétique des séquences paires (au niveau du plasma et du LCR) pour chaque patient a montré l'absence de preuve de variabilité génétique entre les différentes séquences était de 0,0% (0,0%–0,54%). Pour un seul patient, cette distance génétique entre la séquence virale au niveau du plasma et celle au niveau du LCR était égale à 13,8%.

Conclusion

Grâce à cette étude, nous avons montré pour la première fois que le profil des mutations de résistance aux INSTIs est comparable au niveau du plasma et du LCR chez des patients virémiques ou chez ceux sous ARTs. Nous suggérons que dans le cas de virémie plasmatique détectable, les virus présents au niveau du LCR sont dus au passage passif à travers la barrière hémato-encéphalique.

Article 2

J Antimicrob Chemother 2021; **76**: 1553–1557 doi:10.1093/jac/dkab064 Advance Access publication 10 March 2021

Journal of Antimicrobial Chemotherapy

No difference in HIV-1 integrase inhibitor resistance between CSF and blood compartments

Basma Abdi (10)¹, Mouna Chebbi¹, Marc Wirden¹, Elisa Teyssou¹, Sophie Sayon¹, Romain Palich (10)², Sophie Seang², Marc-Antoine Valantin², Anne Simon³, Roland Tubiana², Christine Katlama², Vincent Calvez¹, Anne-Geneviève Marcelin¹ and Cathia Soulie¹*

¹Sorbonne Université, INSERM, Institut Pierre Louis d'Epidémiologie et de Santé Publique, AP-HP, Hôpitaux Universitaires Pitié-Salpêtrière—Charles Foix, Laboratoire de Virologie, F75013, Paris, France; ²Sorbonne Université, INSERM, Institut Pierre Louis d'Epidémiologie et de Santé Publique, AP-HP, Hôpitaux Universitaires Pitié-Salpêtrière—Charles Foix, Service de Maladies Infectieuses, F75013, Paris, France; ³AP-HP, Hôpitaux Universitaires Pitié-Salpêtrière—Service de Médecine Interne, F75013 Paris, France

*Corresponding author. E-mail: cathia.soulie-ext@aphp.fr

Received 18 December 2020; accepted 10 February 2021

Background: Little is known about HIV-1 integrase inhibitor resistance in the CNS.

Objectives: This study aimed to evaluate integrase inhibitor resistance in CSF, as a marker of the CNS, and compare it with the resistance in plasma.

Methods: HIV integrase was sequenced both in plasma and CSF for 59 HIV-1 patients. The clinical and biological data were collected from clinical routine care.

Results: Among the 59 HIV-1 patients, 32 (54.2%) were under antiretroviral (ARV) treatment. The median (IQR) HIV-1 RNA in the plasma of viraemic patients was 5.32 (3.85–5.80) and 3.59 (2.16–4.50) \log_{10} copies/mL versus 4.79 (3.56–5.25) and 3.80 (2.68–4.33) \log_{10} copies/mL in the CSF of ARV-naive and ARV-treated patients, respectively. The patients were mainly infected with non-B subtypes (72.2%) with the most prevalent recombinant form being CRF02_AG (42.4%). The HIV-1 integrase sequences from CSF presented resistance mutations for 9/27 (33.3%) and 8/32 (25.0%) for ARV-naive (L74I, n = 3; L74I/M, n = 1; F157Q, n = 4) and ARV-treated (L74I, n = 6; L74M, n = 1; T97A, n = 1; N155H, n = 1) patients, respectively. Integrase inhibitor resistance mutations in CSF were similar to those in plasma, except for 1/59 patients.

Conclusions: This work shows similar integrase inhibitor resistance profiles in the CNS and plasma in a population of HIV-1 viraemic patients.

Introduction

The introduction of HAART has decreased the rate of opportunistic infections and mortality of people living with HIV infection and enhanced their health and quality of life. The integrase strand transfer inhibitors (INSTIs) are one of the latest classes of antiretro-viral (ARV) drug approved for use as part of ARV therapy to control HIV infection. Current HIV guidelines recommend INSTIs in the treatment of noive or previously ARV-treated HIV-1 patients in three- or two-drug regimens (US FDA, February 2018; EMA, June 2018) and their use is growing worldwide.

However, despite being simplified and/or well-tolerated regimens, suboptimal treatment adherence, possible drug-drug interactions and ARV subpenetration into compartments could lead to virological failure and ARV resistance.¹⁻³ For example, HIV infection of the CNS could be established during primary infection and be persistent in untreated patients.^{4,5} For ARV-treated patients, an HIV-positive viral load in the CNS could be detected in the case of detectable HIV viral load in blood and viral crossing of the blood-brain barrier, or in the case of drug penetration into this compartment being suboptimal allowing viral replication.⁶⁻⁸

Currently, little is known about INSTI resistance in the CNS. We aimed to describe INSTI resistance in CSF, as a representation of the CNS, in comparison with the circulating HIV-1 in plasma.

Methods

Patients

All CSF-plasma pairs with HIV-1 integrase sequences between 2008 and 2020 in Pitie-Salpëtrière Hospital (Paris, France) were studied. Lumbar puncture was reserved for people affected by severe cognitive impairment without aetiological orientation and was part of routine clinical care. Sociodemographic and clinical data, as well as treatment regimen, were

© The Author(s) 2021. Published by Oxford University Press on behalf of the British Society for Antimicrobial Chemotherapy. All rights reserved. For permissions, please email: journals.permissions@oup.com. collected for all studied patients using the computerized medical chart $\mathsf{NADIS}^{\texttt{S}},$ for which all patients provided signed consent.

Genotyping resistance testing

INSTI resistance mutations were determined using the ANRS consensus technique (http://www.hivfrenchresistance.org) and were interpreted with SmartGene® according to the latest Agence Nationale de Recherche sur le Sida et les hépatites virales (ANRS) – Maladies Infectieuses Emergentes version 30 or the Stanford University drug resistance database (Stanford HIVdb) version 8.9-1 algorithm.

Phylogenetic analysis

The HIV-1 integrase sequences were aligned with SeaView software (http:// doua.prabi.fr/software/seaview). The PhyML software was used for maximum-likelihood phylogenetic reconstruction (generalized timereversible model). The reliability of tree topologies was assessed by bootstrapping using 500 replications. Maximum-likelihood trees were rooted on an outgroup: HIV subtype B consensus (HxB2: K03455; www.hiv.lanl.gov). Tree figures were viewed and modified with FigTree software (http://tree. bio.ed.ac.uk/software/figtree/).

Statistical methods

Quantitative variables were summarized as median and IQR and qualitative variables as percentage.

Results

Overall, 59 HIV-1 patients with a median (IQR) age of 44 (36-52) years (27 ARV non-treated, including 21 naive; 32 ARV

Table 1. Characteristics of patients

treated) were analysed (Table 1). Among the treated patients, 22/32 received an ARV treatment containing an INSTI. The median (IQR) HIV-1 RNA in viraemic patients was 5.32 (3.85–5.80) and 3.59 (2.16–4.50) log₁₀ copies/mL in plasma versus 4.79 (3.56–5.25) and 3.80 (2.68–4.33) log₁₀ copies/mL in CSF for ARV-non-treated and ARV-treated patients, respectively (Table 1). The patients were mainly infected with non-B subtypes (72.2%) with the most prevalent recombinant form being CRF02_AG (42.4%). The median (IQR) nadir and CD4 cell counts were 46 (16–20) and 113 (29–274) cells/mm³, respectively (Table 1).

For ARV-non-treated patients, 9/27 (33.3%) had HIV-1 with INSTI resistance mutations in both plasma and CSF: L74I (n=3); L74I/M (n=1); T97A (n=1); and E157Q (n=4) (Table 2). For ARV-treated patients, 8/32 (25.0%) and 9/32 (28.1%) presented HIV-1 with INSTI resistance mutations in CSF and plasma, respectively. The mutations were as follows: L74I (n=6); L74M (n=1); T97A (n=1); and N155H (n=1) both in plasma and CSF. Only one E138K, associated with L74I, was present in plasma only for one patient (Table 2).

Overall, resistance to integrase inhibitors was detected in 11.8% and 13.5% of CSF and plasma samples, respectively, according to the ANRS algorithm. In detail, the rate of INSTI resistance was 18.5% for non-treated patients and 6.2% and 9.4% in CSF and plasma of ARV-treated patients, respectively. According to the Stanford HIVdb version 8.9-1, only the two ARV-treated patients with HIV-1 major INSTI resistance mutations were considered resistant to INSTIs: E138K in plasma; and N155H in both in CSF and plasma.

Characteristic	Total (n = 59)	ARV-non-treated patients (n = 27)	ARV-treated patients $(n=32)$
Age, years, median (IQR)	44 (36-52)	42 (35–48)	48 (37-53)
Male, n (%)	35 (59.3)	15 (55.5)	20 (62.5)
B subtype, n (%)	17 (28.8)	9 (33.3)	8 (25.0)
Time since HIV diagnosis, months, median (IQR)	96.4 (0.0-187.5)	1 (0.3-145.1)	122.0 (40.2-212.6)
CSF HIV-1 RNA, log ₁₀ copies/mL, median (IQR)	4.2 (3.13-4.95)	4.79 (3.56-5.25)	3.80 (2.68-4.33)
Plasma HIV-1 RNA, log ₁₀ copies/mL, median (IQR)	4.71 (3.14-5.44)	5.32 (3.85-5.80)	3.59 (2.16-4.50)
Plasma zenith HIV-1 RNA, log ₁₀ copies/mL, median (IQR)	5.70 (5.09-6.34)	5.72 (5.27-6.20)	5.65 (4.98-6.38)
Nadir CD4 count, cells/mm ³ , median (IQR)	46 (16-120)	38 (15-117)	66 (18-121)
CD4 count, cells/mm ³ , median (IQR)	113 (39-274)	45 (21-118)	188 (79-426)
CD8 count, cells/mm ³ , median (IQR)	664 (406-847)	543 (297-805)	719 (442-917)
Total time under ARV treatment, weeks, median (IQR)	423 (89–789) ^a	461 (220-669) ^a	423 (51-848)
Time under current ARV treatment, weeks, median (IQR)	15 (5-56)		15 (5-56)
Current treatment, n (%)			
NRTIS + PIS	6 (10.2)		6 (18.7)
NRTIS + PIS + MVC	3 (5.1)		3 (9.4)
NRTIS + INSTIS	16 (27.1)		16 (50.0)
PIs + INSTIS	3 (5.1)		3 (9.4)
NRTIS + PIS + INSTIS	2 (3.4)		2 (6.3)
PIs	1 (1.7)		1 (3.1)
NRTIS + NNRTIS + INSTIS	1 (1.7)		1 (3.1)

MVC, maraviroc.

^aSix patients of the ARV-non-treated group, as designated at the time of HIV genotyping, had received ARV treatment in the past.

RAL, raltegravir; RTV, ritonavir; DRV, darunavir; 3TC, lamivudine; FTC, emtricitabine; TDF, tenofovir disoproxil fumarate; LPV, lopinavir; ATV, atazanavir; DTG, dolutegravir; ZDV, zidovu-dine; ABC, abacavir; MVC, maraviroc; nd; not done, F, female; M, male. RAL + RTV + DRV + 3TC RTV + TDF + FTC + ATV FTC + TDF + LPV + RTV RTV + DRV + FTC + TDF LPV + RTV + 3TC + ZDV RAL + ABC + 3TC + MVC DTG + ABC + 3TC RTV + ATV + DTG RAL + RTV + ATV naive no naive naive naive naive ARV naive naive ou CFR02_AG CFR02_AG CR02_AG CRF02_AG CRF011_cpx CRF02_AG CRF02_AG CRF02_AG CFR02_AG CRF02_AG CRF02 AG Subtype Þ В 8 8 A A A Zenith Nadir CD4+ CD8+ 664 812 142 244 692 285 285 285 1424 1424 1424 1104 nd 813 813 813 4407 641 1081 754 Cell count (cells/mm³) 79 99 20 224 99 1195 664 1174 1174 114 39 263 205 116 116 112 25 25 1174 1174 3391 237 7 391 46 31 10 4 6 6.0 5.3 6.1 3.7 5.6 5.6 5.0 5.0 6.6 6.6 6.6 6.1 6.1 6.3 (log10 copies/mL) Plasma HIV viral load CSF 3.4 5.1 3.9 5.3 3.9 5.3 3.9 5.3 5.3 5.3 5.3 2.6 4.5 2.4 4.5 2.1 4.5 5.3 4.7 4.8 6.3 4.4 L74I, E138K L74M T97A N155H **INSTI resistance** Plasma L74I/M L74I L74I L74I T97A E157Q E157Q E157Q E157Q L74I L74I L74I L74I L74I L74I L74I mutations L741/M CSF Table 2. Characteristics of HIV patients with INSTI resistance mutations Time under current ARV treatment (weeks) 46 285 2 62 8 8 9 70 50 treatment (duration until the cessation of treatment, Total time under ARV 667 (116) 17 (326) weeks) 226 1055 1059 420 485 14 601 202 577 HIV diagnosis Time since 384 11263 11137 420 485 485 485 485 625 381 381 (weeks) 0 970 379 350 820 791 Sex Σ Σ ц Σ Σ Σ Σ Σ Σ (years) Age 24 554 47 333 333 552 552 73 73 73 355 552 552 552 339 339 339 336 31 64 42 Patient 5 7 m

HIV-1 integrase inhibitor resistance in compartments

JAC

1555

Downloaded from https://academic.oup.com/jac/article/76/6/1553/6166271 by INSERM user on 21 May 2021

Downloaded from https://academic.oup.com/jac/article/76/6/1553/6166271 by INSERM

user on 21

May

Abdi et al.

Phylogenetic analysis was undertaken for all patients with paired CSF-plasma integrase genes. The median (IQR) genetic distance was 0.0% (0.0%-0.54%) and below 5.1% for all patients except for one (13.8%). This patient had HIV-1 integrase sequences without resistance mutations.

Discussion

This study compared, to the best of our knowledge for the first time, the INSTI resistance profile for HIV patients in plasma and CSF, and evidenced no supplementary INSTI resistance mutations in CSF in comparison with plasma, except for 1/59 patients.

Overall, the presence of INSTI resistance mutations and INSTI resistance were similar in this study between the CNS and plasma, despite the CNS potentially being a sanctuary for HIV replication.⁶ Our results suggested that it was probably the same HIV due to a crossing of the virus through the drug-resistant blood-brain barrier as all patients had a detectable HIV plasma viral load. The phylogenetic analysis concurred with this hypothesis as no noticeable difference was evidenced between the HIV-1 integrase of plasma and CSF. These patients probably had adherence issues and possible drug-drug interactions that limited the treatment efficacy. It would also be interesting to study INSTI resistance in some HIV patients that have discordant HIV viral load, with an undetectable HIV viral load in plasma and a detectable HIV viral load in CSF.

The most commonly observed INSTI resistance mutations were L74I and E157Q. L74I has been reported as a natural polymorphism in HIV patients naive for integrase inhibitors.⁹ The E157Q substitution has been previously described as a polymorphism present in around 5% of HIV obtained from ART-naive patients.¹⁰⁻¹² In our study, the presence of E157Q was higher (14.8%), probably linked to non-B subtypes, especially CRF02_AG. Indeed, this substitution could be present three times more frequently in this subtype than in the B subtype.¹⁰ It could be considered that these major resistance substitutions were polymorphisms and not acquired resistance mutations.

Resistance to at least one ARV anti-integrase drug was quite similar in this study for HIV ARV-treated patients to that in a 2014 French nationwide study (9.4% versus 12.0%, respectively).¹³ On the contrary, the proportion of INSTI resistance in non-treated HIV patients was superior compared with the ARV-naive chronically HIV-infected patients in France during 2015-16.¹² It could be explained by the difference of the proportion of non-B subtypes in the two studies (72.2% versus 54.8% in the present study and the previous nationwide study, respectively), involving a possible increase of natural integrase polymorphism linked to non-B subtypes.¹⁴ The higher prevalence of non-B subtypes in our study could be explained by the continued increase of the diagnosed non-B subtypes already observed between 2010 and 2016 in France.¹² Another hypothesis was that HIV patients evaluated in this study who required a CSF genotype because of their neurological symptoms were mostly late presenters infected with non-B subtypes.

Our study has some limitations due to the small number of subjects and the heterogeneity of this population, as naive, nontreated and ARV-treated patients, and for this last category, the heterogeneous ARV treatment including or not including an INSTI. This is in relation to the observational status, the low rate of practice of, and need for, lumbar puncture and the long period of the study. Indeed, the ARV treatment recommendations have evolved during this time period. Furthermore, it is noticed that lumbar puncture was performed at different timepoints of the disease, at the HIV diagnosis or after several years of the disease.

In conclusion, we showed similar INSTI resistance profiles in CNS and plasma in this population of viraemic patients. Two predominant integrase substitutions were observed, probably due to polymorphism and possibly linked to non-B subtypes. This work suggests that lumbar puncture should be performed only in the presence of events contributing to potential viral rebound in CSF, therapy failure or ART interruption.

Acknowledgements

This work was supported by the Agence Nationale de Recherche sur le Sida et les hépatites virales—Maladies Infectieuses Emergentes (ANRS-MIE).

Funding

This study was carried out as part of our routine work.

Transparency declarations

A.-G.M. and V.C. have received grants and honoraria from Janssen-Cilag, Gilead, MSD and ViiV Healthcare. C.S. has received grants from MSD. R.P., S.S., R.T., M.-A.V., A.S. and C.K. have received travel grants and advisory fees from Gilead, ViiV Healthcare and Merck. All other authors: none to declare.

References

1 Nachega JB, Parienti J-J, Uthman OA *et al*. Lower pill burden and oncedaily antiretroviral treatment regimens for HIV infection: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Clin Infect Dis* 2014; **58**: 1297–307.

2 Bangsberg DR, Perry S, Charlebois ED et al. Non-adherence to highly active antiretroviral therapy predicts progression to AIDS. AIDS 2001; 15: 1181–3.

3 Gardner EM, Sharma S, Peng G et al. Differential adherence to combination antiretroviral therapy is associated with virological failure with resistance. AIDS 2008; 22: 75–82.

4 Spudich SS, Huang W, Nilsson AC *et al.* HIV-1 chemokine coreceptor utilization in paired cerebrospinal fluid and plasma samples: a survey of subjects with viremia. *J Infect Dis* 2005; **191**: 890-8.

5 Pilcher CD, Shugars DC, Fiscus SA *et al.* HIV in body fluids during primary HIV infection: implications for pathogenesis, treatment and public health. *AIDS* 2001; **15**: 837–45.

6 Anderson AM, Muñaz-Moreno JA, McClernon DR et al. Prevalence and correlates of persistent HIV-1 RNA in cerebrospinal fluid during antiretroviral therapy. J Infect Dis 2017; 215: 105–13.

7 Letendre S, Marquie-Beck J, Capparelli E *et al.* Validation of the CNS penetration-effectiveness rank for quantifying antiretroviral penetration into the central nervous system. *Arch Neurol* 2008; **65**:65–70.

8 Nightingale S, Michael BD, Fisher M *et al.* CSF/plasma HIV-1 RNA discordance even at low levels is associated with up-regulation of host inflammatory mediators in CSF. *Cytokine* 2016; 83: 139–46.

9 Lataillade M, Chiarella J, Kozal MJ. Natural polymorphism of the HIV-1 integrase gene and mutations associated with integrase inhibitor resistance. *Antivir Ther* 2007; **12**: 563–70.

103

10 Charpentier C, Malet I, Andre-Garnier E et al. Phenotypic analysis of HIV-1 E157Q integrase polymorphism and impact on virological outcome in patients initiating an integrase inhibitor-based regimen. J Antimicrob Chemother 2018; **73**: 1039–44.

11 Saladini F, Giannini A, Boccuto A *et al.* The HIV-1 integrase E157Q polymorphism per se does not alter susceptibility to raltegravir and dolutegravir in vitro. *AIDS* 2017; **31**: 2307–9.

 ${\bf 12}\,$ Assoumou L, Bocket L, Pallier C et al. Stable prevalence of transmitted drug resistance mutations and increased circulation of non-B subtypes in

antiretroviral-naive chronically HIV-infected patients in 2015/2016 in France. J Antimicrob Chemother 2019; **74**: 1417–24.

13 Assoumou L, Charpentier C, Recordon-Pinson P *et al.* Prevalence of HIV-1 drug resistance in treated patients with viral load >50 copies/mL: a 2014 French nationwide study. *J Antimicrob Chernother* 2017; **72**: 1769–73.

14 El Bouzidi K, Kemp SA, Datir RP *et al.* High prevalence of integrase mutation L74I in West African HIV-1 subtypes prior to integrase inhibitor treatment. *J Antimicrob Chemother* 2020; **75**: 1575–9.

1557

2.3 Article 3

La présence de mutations (G) vers (A) marqueurs de l'activité des APOBEC3 est associée à un niveau de réservoir bas et au sous type viral non-B

Résumé de l'article

Contexte

Les APOBEC3 sont des enzymes de restriction cellulaire très impliquées dans l'évolution naturelle de l'infection par le VIH-1. Le rôle principal de ces apolipoprotéines est la production de mutations (G) vers (A) au cours du cycle de réplication du VIH-1 conduisant à la production de virus défectifs incapables de donner naissance à de nouveaux virions. Plusieurs études ont montré que les APOBEC3 sont impliquées dans la variabilité génétique et la diversité des sous-populations virales dès les premières phases de l'infection. Une étude a montré que les génomes défectifs étaient systématiquement détectés chez cinq patients traités à long terme et leur niveau élevé était associé à une petite taille du réservoir viral. Certaines mutations (G) vers (A) peuvent être associées à des mutations de résistance aux ARTs dont l'impact thérapeutique n'a jamais été étudié.

Une meilleure compréhension de tous les facteurs impliqués dans la diversité et la persistance du réservoir viral est primordial afin de pouvoir optimiser de nouvelles stratégies d'éradication de ce réservoir ou de cure fonctionnelle.

Objectif

L'objectif principal de notre étude est d'étudier la relation de l'activité des APOBEC3 avec le réservoir viral chez des patients en suppression virologique à long terme ainsi que la détermination des facteurs favorisant à l'apparition de ces mutations de résistance (G) vers (A) associées à la résistance aux ARTs. Pour cela, nous avons comparé les caractéristiques cliniques et virologiques chez des patients séropositifs ayant ou non des mutations de résistance aux ARTs liées à l'activité des APOBEC3 et avec ou sans codons stop.

Matériels et Méthodes

Notre étude est rétrospective non interventionnelle, a été menée à l'hôpital la Pitié Salpêtrière sur des patients suivis au long cours dans les services des Maladies infectieuses et Tropicales et le service de Médecine Interne.

Nous avons inclus tous les patients séropositifs dont les séquences Sanger du gène de la TI au niveau de l'ADN étaient disponibles dans notre base de données SmartGene \mathbb{R} entre Janvier 2011 et Juin 2019 et dont la CVp \leq 20 copies/mL. Nous avons sélectionné notre premier groupe de patients en fonction de la présence sur le gène de la TI de codons stop et au moins une des cinq transitions (G) vers (A) identifiées dans la liste de Stanford comme étant des DRAMs (D67N, E138K, M184I, E190G/S et M230I) disponible sur le site « https://hivdb.stanford.edu/page/apobecs/ ». Le gène de la TI a été choisi car c'est une des régions les plus sensibles aux hypermutations induites par APOBEC3.

Nous avons inclus dans le premier groupe appelé APOBEC+ tous les patients répondant aux critères d'inclusion cités ci-dessus. Nous avons inclus dans un deuxième groupe de contrôle appelé APOBEC-, en se basant sur la même période d'étude, des patients avec une $CVp \le 20$ copies/mL et n'ayant pas sur leurs séquences du gène de la TI de transitions (G) vers (A) ni de codons stop.

Nous avons recueilli les données cliniques de la base des données NADIS des deux services cliniques. Toutes les analyses ont été faites de façon rétrospective sur des échantillons de PBMC à partir de prélèvements sanguins périphériques effectués dans le cadre du suivi standard des patients. Nous avons quantifié la CV totale de l'ADN-VIH avec la technique commercialisée par Biocentric, Bandol, France (GENERIC HIV DNA Cell). Nous avons analysé les hypermutations (nombre élevé de transitions (G) vers (A)) avec le programme Hypermut disponible le sur site (https://www.hiv.lanl.gov/contente/sequence/HYPERMUT/hypermut.html). Une séquence est considérée hypermutée si la valeur de p obtenue avec le test Fisher de comparaison de la séquence du patient avec celle de la référence HxB2 (K03455) est inférieure à 0,05. Nous avons fait les analyses statistiques avec le logiciel Statview (SAS Institute Inc., version 5.0.1, Cary, NC, USA).

<u>Résultats</u>

Nous avons inclus 184 patients dont 92 (50 %) inclus dans le groupe APOBEC+. L'âge médian des patients était de 58 ans (IQR 53–65) et 74,5% des patients étaient des hommes. Tous les patients étaient traités à long terme avec une médiane de durée du traitement de 19,1 ans (IQR 13,7–22,2). 99,5% des patients ont reçu au moins un inhibiteur de la TI durant la période du suivi. Leur CVp était indétectable depuis au moins 6,9 ans (IQR 3,1-11). Le sous-type viral majoritaire était de type B (69%) avec une prédominance significative (p=0.017) de ce sous-type dans le groupe APOBEC-. La CV de l'ADN VIH total au moment du génotype dans l'ADN était de 2,34 log₁₀ copies/10⁶ cellules (IQR 1,85-2,67). Nous avons trouvé une différence significative (P<0,001) entre les niveaux de l'ADN VIH chez les deux groupes (médiane égale à 2,13 log₁₀ copies/10⁶ cellules (IQR 1,60-2,60) vs 2,52 log₁₀ copies/10⁶ cellules (IQR 2,19–2,71) chez les APOBEC+ et APOBEC-, respectivement.

La distribution des DRAMs (G) vers (A) et des codons stop dans le groupe APOBEC+ était de 15,2 % (14/92) D67N ; 2,2% (2/92) E138K ; 33,7% (31/92) M184I ; 1,1%(1/92) E190G/S ; 41,3 % (38/92) M230I et 100 % (92/92) de codons stop. Les codons stop ont été mis en évidence principalement au niveau du tryptophane (UGG) dans les positions 71, 88, 153, 212, 229, 239 et 266. Nous n'avons pas trouvé de différence significative des DRAMS autre que (G) vers (A) entre les deux groupes. Nous avons recherché par la méthode de régression logistique univariée et multivariée les facteurs cliniques et immuno-virologiques associés à l'activité des APOBEC3 et à l'apparition des DRAMs (G) vers (A). Nous avons retenu trois facteurs pour l'analyse multivariée : l'origine ethnique (p = 0,018), la CV de l'ADN VIH (P = 0,016) et le sous-type viral (P = 0,016). L'analyse multivariée a révélé que les mutations de résistance (G) vers (A) et les codons stop sont indépendamment associés avec une faible CV de l'ADN VIH ainsi qu'avec le sous-type viral non B.

Conclusion :

Nous avons montré pour la première fois l'association significative de l'activité des APOBEC3 avec une taille plus faible du réservoir viral et avec le sous-type viral non-B.
J Antimicrob Chemother doi:10.1093/jac/dkab123

Journal of Antimicrobial Chemotherapy

Presence of HIV-1 G-to-A mutations linked to APOBEC editing is more prevalent in non-B HIV-1 subtypes and is associated with lower HIV-1 reservoir

Basma Abdi (10)¹*, Sidonie Lambert-Niclot², Marc Wirden¹, Aude Jary¹, Elisa Teyssou¹, Sophie Sayon¹, Romain Palich (20)³, Roland Tubiana³, Anne Simon⁴, Marc-Antoine Valantin³, Christine Katlama³, Laurence Morand-Joubert², Vincent Calvez¹, Anne-Geneviève Marcelin¹ and Cathia Soulie¹

¹Sorbonne Université, INSERM, Institut Pierre Louis d'Epidémiologie et de Santé Publique (IPLESP UMRS 1136), AP-HP, Hôpital Pitié Salpêtrière, Laboratoire de virologie, Paris, France; ²Sorbonne Université, INSERM, Institut Pierre Louis d'Epidémiologie et de Santé Publique (IPLESP UMRS 1136), AP-HP, Hôpital Saint Antoine, Laboratoire de virologie, Paris, France; ³Sorbonne Université, INSERM, Institut Pierre Louis d'Epidémiologie et de Santé Publique (IPLESP UMRS 1136), AP-HP, Hôpital Pitié Salpêtrière, Service des Maladies Infectieuses, Paris, France; ⁴Sorbonne Université, INSERM, Institut Pierre Louis d'Epidémiologie et de Santé Publique (IPLESP UMRS 1136), AP-HP, Hôpital Pitié Salpêtrière, Service de Médecine Interne, Paris, France

*Corresponding author. E-mail: basma.abdi@aphp.fr

Received 9 December 2020; accepted 14 March 2021

Objectives: APOBEC3 editing activity contributes to sequences variation and viral diversification. We aimed to characterize virological and clinical factors associated with G-to-A mutations and stop codons in the HIV-1 reservoir, markers of APOBEC3 footprints, in order to better understand HIV-1 diversity among virologically suppressed HIV-1-infected patients.

Methods: Immuno-virological and clinical factors were compared between 92 patients harbouring G-to-A mutations and stop codons (APOBEC+) in the reverse transcriptase gene and 92 patients without G-to-A mutations (APOBEC-) and stop codons in their DNA genotypes.

Results: Patients were predominantly men (74.5%) and were mostly infected by B-subtype (69.0%), with 44.1% and 55.9% in APOBEC+ and APOBEC- groups, respectively. At time of HIV DNA genotypes, the total cell-associated HIV-1 DNA load was 2.34 log₁₀ copies/10⁶ cells (IQR 1.85-2.67) and 33.2% of them had a detectable ultrasensitive plasma viral load. Hypermutated sequences were identified in 28.2% of the APOBEC+ group. The median total cell-associated HIV-1 DNA level was significantly lower in APOBEC+ than APOBEC- group: 2.13 log₁₀ copies/10⁶ cells (IQR 1.60-2.60) versus 2.52 log₁₀ copies/10⁶ cells (IQR 2.19-2.71) (P<0.001), respectively. Presence of G-to-A mutations and stop codon was independently associated with HIV-1 subtype non-B (P=0.017).

Conclusions: These results show an independent association between the presence of G-to-A mutations and stop codons with HIV-1 subtype non-B and low proviral DNA that could be explained by the APOBEC3 footprints and restriction of DNA synthesis and integration. However, further investigations are needed to study the contribution of Vif amino acid variability among HIV-1 subtypes.

Introduction

APOBEC3 (apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like) is an important innate immune family of cytidine deaminase proteins. These cellular proteins actively block retroviral infection by hitchhiking newly produced viral particles.¹ We distinguished different enzymes in the APOBEC3 family, but mainly APOBEC3F and APOBEC3G; they have slightly different substrate specificities, produce G-to-A transitions and profoundly inhibit the replication of HIV-1.^{1,2} The antiviral activity of APOBEC3 is counteracted by the HIV viral infectivity factor (Vif) protein by mediating its degradation by the proteasome. When Vif is defective, the result is hypermutation—an inordinate number of identical transitions G-to-A.^{1,3,4}

Several studies have shown that APOBEC3 contributes to sequences variation and viral diversification because of naturally occurring defective HIV variants. 3,5

© The Author(s) 2021. Published by Oxford University Press on behalf of the British Society for Antimicrobial Chemotherapy. All rights reserved. For permissions, please email: journals.permissions@oup.com.

1 of 5

One study demonstrates also that defective genomes were systematically detected in five patients on long-term ART and this high level of defective genomes was correlated with a small size of HIV proviral DNA. 6

A better understanding of HIV-1 diversity and the persistence of the HIV-1 reservoir is necessary to characterize the viruses in order to develop new therapeutic approaches and to better target HIV-1 patients susceptible to receive optimal eradication strategies. Thus, we aim here to compare patients with or without HIV-1 APOBEC mutations and stop codons in the HIV-1 reservoir in order to determine which virological or clinical factors could be associated with APOBEC editing activity.

Materials and methods

Study design and patients

One hundred and eighty-four HIV-1 patients were retrospectively studied at the Pitié-Salpétrière haspital, Paris, France. The study focused on the reverse transcriptase (RT) gene—the region most torgeted by APOBEC mutations (https://hivdb.stanford.edu/page/apobecs/). The only five G-to-A transitions identified in this list as RT drug resistance-associated mutations (DRAMs) (DG7N, E138K, M184I, E190G/S and M230) were used to select patients. Then, we included all HIV-1 patients between January 2011 and June 2019 with a plasma viral load (pVL) \leq 20 copies/mL under ART having at least one of these G-to-A DRAMs and stop codons in the RT gene in their HIV-1 DNA genotypic drug resistance test performed by Sanger sequencing according to the ANRS HIV Drug Resistance procedures (APOBEC+) (n = 92). A second group of patients with a pVL \leq 20 copies/mL and without G-to-A DRAMs and stop codons in the included in the same time period as the first group (APOBEC-) (n = 92).

Cumulative HIV-1 RNA and DNA DRAMs were interpreted using the latest ANRS resistance algorithm (http://www.hivfrenchresistance.org/).

This work was a retrospective non-interventional study with no addition to standard care procedures. The study was carried out in accordance with the Declaration of Helsinki.

Total HIV-DNA quantification

Cell-associated HIV-1 DNA was quantified by ultrasensitive real-time PCR (Generic HIV-DNA assay, Biocentric, Bandol, France) as previously described. 7

Ultrasensitive viral load

The pVL was quantified using the Cobas AmpliPrep/CobasTaqMan HIV-1 assay (Roche Diagnostics, Switzerland; lower detection limit of 20 copies/mL). Ultrasensitive viral load (USpVL) in the range of 1–20 copies/mL was indicated qualitatively (presence or absence of detectable signal).⁸

Identification of hypermutated G-to-A sequences

Hypermutation was analysed using the Hypermut Analysis and Detection of APOBEC-induced Hypermutation program (https://www.hiv.lanl.gov/con tent/sequence/HYPERMUT/hypermut.html) in DNA sequences. A sequence was considered hypermutated if it registered a *P* value less than 0.05 on the Fisher's exact test that compared the number of G-to-A changes due to APOBEC3 versus HxB2 reference (K03455).

Statistical analysis

All reported values are medians with IQR for continuous variables and frequencies and percentages for categorical variables. We used the

Mann–Whitney test and the χ^2 test for comparison between patients' groups APOBEC+ and APOBEC-. Univariable and multivariable models were used to identify factors associated with G-to-A mutations: age, sex, ethnicity, time from HIV diagnosis, duration of ART, time to undetectable pVL, zenith of pVL, nadir of CD4 cells count, baseline CD4/CD8 ratio, HIV-1 subtype, and at time of HIV-1 DNA genotypic drug resistance test: HIV-1 DNA viral load, USpVL, CD4 cells count, CD4/CD8 ratio and hypermutation. Variables with a univariable *P* value <0.2 were retained in the multivariable analysis. All reported *P* values are two-tailed, with significance set at 0.05. Analyses were performed using Statview for Windows (SAS Institute Inc., version 5.0.1, Cary, NC, USA).

Results

Patients' characteristics

One hundred and eighty-four patients were included in the study. They were predominantly men (74.5%) and Caucasian (71.7%). They were diagnosed with HIV-1 22.8 years ago (15.5-27.2), ART treated for 19.1 years (13.7-22.2) and had undetectable pVL for 6.9 years (3.1-11.0) (Table 1). One hundred and eighty-three patients out of 184 (99.45%) had received RT inhibitors in the past. The patients were mostly infected by B-subtype (69.0%), with 44.1% and 55.9% in APOBEC+ and APOBEC- (P=0.017), respectively. Details of frequency of HIV-1 subtypes are presented in Table S1 (available as Supplementary data at JAC Online). At the time of HIV DNA genotype test, the total cell-associated HIV-1 DNA load was 2.34 log₁₀ copies/10⁶ cells (IQR 1.85-2.67) and 33.2% of all patients had a detectable USpVL. The median total cell-associated HIV-1 DNA level was significantly lower in APOBEC+ than APOBEC-: 2.13 (IQR 1.60-2.60) versus 2.52 log10 copies/106 cells (IQR 2.19-2.71) (P<0.001), respectively.

HIV-1 sequences characteristics

The distribution of HIV-1 G-to-A DRAMs and stop codons in the study participants' sequences of the APOBEC+ (n = 92) was: 15.2% (14/92) D67N, 2.2% (2/92) E138K, 33.7% (31/92) M184I, 1.1% (1/92) E190G/S, 41.3% (38/92) M230I, and 100% (92/92) stop codon. Stop codons were mostly found at the following amino acid positions: W71, W88, W153, W212, W229, W239 and W266.

The distribution of HIV-1 DRAMs not APOBEC related is shown in Table S2. Globally, there is no significant difference between the two groups (APOBEC+ and APOBEC-) according to the DRAMs prevalence.

Hypermutated sequences were identified in 28.2% (26/92) in APOBEC+. As expected, no patients in APOBEC- had hypermutated HIV-1 sequences.

Risk factors associated with APOBEC mutations and stop codons

Univariate and multivariate logistic regression analyses were performed to assess independent associations between immunevirological and clinical data and APOBEC mutation's presence (Table 2). Three factors were retained for the multivariable analysis: ethnicity (P=0.018), total cell-associated HIV-1 DNA level (P=0.016), and HIV-1 subtype (P=0.016). The multivariable analysis showed that G-to-A DRAMs and stop codons presence was independently associated with HIV-1 subtype and level of total cell-associated HIV-1 DNA. The presence of G-to-A DRAMs

Association of APOBEC3 footprints in HIV-1 DNA with non-B HIV-1 and low HIV-1 reservoir

Table 1. Patients' characteristics

	All patients,	APOBEC- group,	APOBEC+ group,	
	n=184	n=92	n=92	P value
Sex (female versus male), n (%)				
female	47 (25.5)	23 (48.9)	24 (51.1)	0.866
male	137 (74.5)	69 (50.4)	68 (49.6)	
Age (years), median (IQR)	58 (53-65)	59 (54-65)	56 (51-65)	0.063
Ethnicity (Caucasian versus non-Caucasian), n (%)				
Caucasian	132 (71.7)	66 (50)	66 (50)	1.000
non-Caucasian	52 (28.3)	26 (50)	26 (50)	
Time from HIV diagnosis (years), median (IQR)	22.8 (15.5-27.2)	24.6 (17.6-27.6)	21.7 (14.3-26.5)	0.072
Duration of ART (years), median (IQR)	19.1 (13.7-22.2)	19.78 (15.4-22.5)	18.7 (12.4-22.0)	0.187
Time to undetectable pVL (years), median (IQR)	6.95 (3.1-11.0)	6.77 (3.5-10.9)	7.0 (2.1-12.3)	0.845
Zenith of pVL (log ₁₀ copies/mL), median (IQR)	4.96 (4.25-5.44)	4.99 (4.25-5.38)	4.90 (4.25-5.47)	0.743
Nadir of CD4 (cells count/mm ³), median (IQR)	176 (78-289)	176 (61-281)	173 (80-297)	0.998
CD4 at baseline (cells count/mm ³), median (IQR)	315 (176-434)	333 (202-504)	312 (161-419)	0.401
CD4/CD8 ratio at baseline, median (IQR)	0.36 (0.20-0.60)	0.37 (0.20-0.60)	0.34 (0.20-0.60)	0.753
HIV-1 subtype, n (%)				
В	127 (69.0)	71 (55.9)	56 (44.1)	0.017
non-B	57 (31.0)	21 (36.8)	36 (63.2)	
Total cell-associated HIV-1 DNA (log ₁₀ /10 ⁶ cells), median (IQR)	2.34 (1.85-2.67)	2.52 (2.19-2.71)	2.13 (1.60-2.60)	<0.001
Ultrasensitive pVL, n (%)	61 (33.2)	32 (52.5)	29 (47.5)	0.638
CD4 (cells count/mm ³), median (IQR)	617 (446-836)	669 (462-852)	602 (402-789)	0.092
CD4/CD8 ratio, median (IQR)	0.82 (0.58-1.26)	0.83 (0.60-1.41)	0.81 (0.54-1.18)	0.469

pVL, plasma viral load.

All reported values are medians with IQR for continuous variables and frequencies and percentages for categorical variables.

Mann–Whitney and χ^2 tests were used for comparison between patients APOBEC+ and APOBEC-.

Statistical significance set at 0.05 is indicated in bold.

and stop codons was 2.8 times higher (95% CI 1.25–6.35) for patients infected by HIV-1 non-B subtypes and inversely related to the level of total cell-associated HIV-1 DNA (OR 0.34, 95% CI 0.18–0.63).

Discussion

In the context of viral diversity and the development of new therapeutic approaches for HIV-1 cure, careful consideration must be given to the identification and characterization of HIV-1 reservoir. The ability of APOBEC editing activity to introduce mutations into viral DNA may contribute to viral diversity. Here, we found in a large number of virologically well-controlled HIV-1 patients that G-to-A mutations DRAMs and stop codons presence in RT sequences were associated with a smaller size of HIV-1 reservoir and HIV-1 non-B subtypes.

Our results are in line with other studies showing an inverse association between APOBEC3 protein activity and level of HIV proviral DNA. Fourati *et al.*⁵ studied the relationship between the size of the reservoir and the frequency of defective genomes in five patients on successful ART and five untreated patients and concluded that a high level of defective genomes was correlated with a small size of HIV proviral DNA. Other researchers quantified provirus and APOBEC3G levels in resting CD4+ T lymphocytes in HIV controllers and ART-suppressed non-controllers and concluded that the highest levels of APOBEC3G protein in resting memory CD4+ T cells were significantly associated with the lowest levels of DNA provirus.⁹ These results could be explained by the innate activity of APOBEC3 on the viral genome. Effectively, APOBEC3 family is the host restriction factor that inhibits HIV-1 replication, DNA synthesis and integration by blocking viral plus-strand DNA transfer and inhibiting provirus establishment in the host genome.¹⁰

We showed also that the presence of HIV-1 G-to-A DRAMs linked to APOBEC editing was more prevalent in non-B HIV-1 subtypes. This finding could be explained by the genetic variability of Vif that counteracts the antiviral activity of APOBEC3 by proteasome degradation and polymorphism in APOBEC3 gene family members depending on the HIV-1 viral subtype. Previous works have focused on the contribution of Vif amino acid variability among HIV-1 subtypes and they all reported that Vif proteins derived from HIV-1 clinical and viral isolates of different subtypes varied in their activities against APOBEC3, but there were some discrepancies between results.¹¹⁻¹³ Binka et al.¹¹ have found that several non-B subtypes Vif alleles have an efficient anti-APOBEC3 activity similar to the commonly used subtype B Vifs. Other researchers showed that Vif derived from a subtype C molecular clone was less effective at overcoming APOBEC3-mediated inhibition than Vif derived from either subtype B or CRF02_AG molecular clones.¹² However, Iwabu et al.¹³ found that Vif protein derived from subtype C strains harboured the most robust anti-APOBEC3 activity.¹³ Limitation of all these studies is the sample sizes, which are not sufficiently representative of all the HIV-1 subtypes'

Table 2. Univariate and multivariate analysis to identify factors associated with APOBEC editing activity

	Univariate ana	Univariate analysis		Multivariate analysis	
	OR (95% CI)	P value	OR (95% CI)	P value	
Sex (female versus male)					
female	1				
male	2.38 (0.62-9.20)	0.206			
Age (years)	0.98 (0.94-1.02)	0.464			
Ethnicity (non-Caucasian versus Caucasian)					
non-Caucasian	1		1		
Caucasian	4.87 (1.31-18.08)	0.018	1.76 (0.76-4.05)	0.180	
Time from HIV diagnosis (years)	1.00 (1.00-1.00)	0.825			
Duration of ART (years)	1.00 (1.00-1.00)	0.650			
Time to undetectable pVL (years)	1.00 (1.00-1.00)	0.928			
Zenith of pVL (log ₁₀ copies/mL)	0.94 (0.56-1.57)	0.819			
Nadir of CD4 (cells count/mm ³)	1.00 (0.99-1.00)	0.830			
CD4 (cells count/mm ³)	1.00 (0.99-1.00)	0.833			
CD4/CD8 ratio	1.87 (0.20-17.23)	0.578			
HIV sub-type (B versus non-B)					
В	1		1		
non-B	5.08 (1.36-18.98)	0.016	2.81 (1.25-6.35)	0.013	
HIV parameters at time of HIV-1 DNA genotypic drug res	sistance				
total cell-associated HIV-1 DNA (log ₁₀ /10 ⁶ cells)	0.30 (0.11-0.80)	0.016	0.34 (0.18-0.63)	0.001	
ultrasensitive pVL	1.51 (0.55-4.17)	0.421			
CD4 (cells count/mm ³)	1.00 (0.99-1.00)	0.677			
CD4/CD8 ratio	0.77 (0.21-2.78)	0.695			

pVL, plasma viral load.

Univariable P values <0.2 were retained in the multivariable analysis.

Statistical significance set at 0.05 is indicated in bold.

diversity. In our study, we were not able to identify a specific non-B subtype that was associated with the presence of G-to-A DRAMs and stop codons. Thus, further investigations should be conducted focusing on particular non-B subtypes (i.e. C or CRF02 AG).

Our study had some limitations such as the sample size, although all HIV-1 patients with APOBEC DRAMs and stop codons were selected during the studied time period. Multivariate models with relative small sample sizes tend to be unstable, thus the future study could benefit more from a larger sample size. Furthermore, the use of the classical Sanger sequencing technology could underestimate resistance and stop codons. The sensitivity of Sanger sequencing in detecting resistant variants within quasi-species of WT viruses is \sim 20%, whereas the sensitivity of the ultra-deep sequencing (UDS) assay allows the use of a sensitivity threshold as low as 1%.¹⁴ Rodriguez and colleagues¹⁴ showed that UDS have better sensitivity in detecting mutations. They also found more stop codons by UDS 1% than bulk sequencing (44% versus 26%).¹⁴ However, Sanger sequencing is a widely used technique in standard follow-up of HIV-patients.

The ability of APOBEC3 to introduce G-to-A DRAMs and stop codons into HIV-1 viral DNA, and its contribution to viral diversity and viral pathogenesis, is now clearly established. However, some factors could influence this contribution and this study showed that there is an independent association between the presence of G-to-A DRAMs and stop codons with HIV-1 subtype non-B and low proviral DNA. The biological mechanisms underlying these associations should be further investigated in order to better characterize HIV-1 reservoir and to help in developing new therapeutic approaches for HIV-1 cure.

Funding

This work was funded by Agence Nationale de Recherche sur le Sida et les hépatites – Maladies Infectieuses Emergentes (ANRS-MIE, AC43).

Transparency declarations

A.-G.M. and V.C. have received grants and honoraria from Janssen-Cilag, Gilead, MSD and ViiV Healthcare. L.M.-J. has received honoraria from Janssen-Cilag, Gilead, MSD, Mylan and ViiV Healthcare. S.L.-N. has received grants from Gilead and ViiV Healthcare. R.P. has received travel grants and honoraria from Gilead, ViiV Healthcare, Janssen and Merck. All other authors: none to declare.

Supplementary data

Tables S1 and S2 are available as Supplementary data at JAC Online

References

1 Harris RS, Liddament MT. Retroviral restriction by APOBEC proteins. Nat Rev Immunol 2004; 4: 868–77.

2 Fourati S, Lambert-Niclot S, Soulie C *et al.* Differential impact of APOBEC3driven mutagenesis on HIV evolution in diverse anatomical compartments. *AIDS* 2014; 28: 487–91.

3 Simon V, Zennou V, Murray D *et al.* Natural variation in Vif: differential impact on APOBEC3G/3F and a potential role in HIV-1 diversification. *PLoS Pathogens* 2005; **1**:e6.

4 Mehle A, Strack B, Ancuta P *et al.* Vif overcomes the innate antiviral activity of APOBEC3G by promoting its degradation in the ubiquitin-proteasome pathway. *J Biol Chem* 2004; **279**: 7792–8.

5 Fourati S, Malet I, Lambert S *et al.* E138K and M184I mutations in HIV-1 reverse transcriptase coemerge as a result of APOBEC3 editing in the absence of drug exposure. *AIDS* 2012; **26**: 1619–24.

6 Fourati S, Lambert-Niclot S, Soulie C *et al.* HIV-1 genome is often defective in PBMCs and rectal tissues after long-term HAART as a result of APOBEC3 editing and correlates with the size of reservoirs. *J Antimicrob Chemother* 2012; 67: 2323–6.

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

8 Lambert-Niclot S, Grude M, Meynard J-L *et al.* Ultrasensitive human immunodeficiency virus type 1 viral load as a marker of treatment choice for simplification strategies. *Clin Infect Dis* 2018; **67**: 1883–9.

9 Pasquale MD, Kourteva Y, Allos T *et al.* Lower HIV provirus levels are associated with more APOBEC3G protein in blood resting memory CD4+ T lymphocytes of controllers in vivo. *PLoS One* 2013: **8**: e76002.

10 Mbisa JL, Bu W, Pathak VK. APOBEC3F and APOBEC3G inhibit HIV-1 DNA integration by different mechanisms. *J Virol* 2010; **84**: 5250–9.

11 Binka M, Ooms M, Steward M *et al.* The activity spectrum of Vif from multiple HIV-1 subtypes against APOBEC3G, APOBEC3F, and APOBEC3H. *J Virol* 2012; **86**: 49–59.

12 Lisovsky I, Schader SM, Sloan RD *et al.* HIV-1 subtype variability in Vif derived from molecular clones affects APOBEC3G-mediated host restriction. *Intervirology* 2013; **56**: 258–64.

13 Iwabu Y, Kinomoto M, Tatsumi M *et al.* Differential anti-APOBEC3G activity of HIV-1 Vif proteins derived from different subtypes. *J Biol Chem* 2010; **285**: 35350–8.

14 Rodriguez C, Nere ML, Demontant V *et al.* Ultra-deep sequencing improves the detection of drug resistance in cellular DNA from HIV-infected patients on ART with suppressed viraemia. *J Antimicrob Chemother* 2018; **73**: 3122–8.

Supplementary materials

	All patients	APOBEC- group	APOBEC+ group
	n=184	n=92	n=92
В	127 (69)	71 (55.9)	56 (44.1)
CRF02_AG	25 (13.6)	11 (44)	14 (56)
Α	3 (1.63)	1 (33.3)	2 (66.7)
D	3 (1.6)	1 (33.3)	2 (66.7)
F	1 (0.5)	1 (100)	0 (0)
G	4 (2.2)	1 (25)	3 (75)
Н	1 (0.5)	0 (0)	1 (100)
CRF06_cpx	4 (2.2)	1 (25)	3 (75)
CRF13_cpx	2 (1.1)	1 (50)	1 (50)
CRF45_cpx	1 (0.5)	0 (0)	1 (100)
Non determined	13 (7.1)	4 (30.8)	9 ()

Table S1: Frequency of HIV-1 subtype. All reported values are frequencies and percentages

for categorical variables

	All patients	APOBEC- group	APOBEC+ group	P		
	n=184	n=92	n=92	value		
HIV-1 drug resistance associated mutations						
M41L	46 (25)	27 (58.7)	19 (41.3)	0.173		
E44D	8 (4.3)	5 (62.5)	3 (37.5)	0.470		
K65R	3 (1.6)	1 (33.3)	2 (66.7)	0.560		
T69D	7 (3.8)	3 (42.9)	4 (57.1)	0.700		
K70R	15 (8.2)	7 (46.7)	8 (53.3)	0.788		
L74V	12 (6.5)	5 (41.7)	7 (58.3)	0.550		
K101E	4 (2.2)	2 (50)	2 (50)	1.000		
K103N	15 (8.2)	5 (33.3)	10 (66.7)	0.178		
Y115F	2 (1.1)	1 (50)	1(50)	1.000		
E138A	11 (6)	4 (36.4)	7 (63.6)	0.351		
M184V	55 (29,9)	30 (54.5)	25 (45.5)	0.421		
Y181C	10 (5.4)	5 (50)	5 (50)	1.000		
Y188L	2 (1.1)	1 (50)	1 (50)	1.000		
G190A	5 (2.7)	2 (40)	3 (60)	0.650		
L210W	30 (16.3)	15 (50)	15 (50)	1.000		
T215Y	44 (23.9)	24 (54.5)	20 (45.5)	0.489		
T215D	6 (3.3)	2 (33.3)	4 (66.7)	0.406		
T215E	2 (1.1)	1 (50)	1 (50)	1.000		
Т215Н	3 (1.6)	1 (33.3)	2 (66.7)	0.560		
T215S	19 (10.3)	6 (31.6)	13 (68.4)	0.090		
K219Q	6 (3.3)	3 (50)	3 (50)	1.000		
Р225Н	3 (1.6)	0 (0)	3 (100)	0.081		

Table S2: Cumulative HIV-1 drug resistance associated mutations not APOBEC related

in reverse transcriptase gene. All reported values are frequencies and percentages for categorical variables. Chi2 test is used for comparison between patients APOBEC+ and APOBEC-. Statistical significance set at 0.05 is indicated in bold.

3. DISCUSSION ET PERSPECTIVES

L'infection par le VIH demeure un problème important de santé publique de portée mondiale. Les avancées thérapeutiques majeures des dernières décennies ont permis de transformer cette maladie mortelle en maladie chronique tout en améliorant la qualité de vie des PVVIH. En revanche, une caractéristique importante du virus VIH-1 est sa grande diversité génétique et son évolution rapide qui influencent la pathogenèse, la transmission, le diagnostic et la gestion clinique de l'infection. L'intégration du virus dans le génome des cellules, la formation rapide du réservoir viral et le phénomène de compartimentation au niveau des sanctuaires difficilement atteignables par les ARTs constituent un obstacle majeur pour l'éradication de cette infection. Malgré les progrès techniques et les données actuelles, de nouvelles investigations sont nécessaires afin d'approfondir nos connaissances sur les réservoirs viraux, d'optimiser et de développer de nouvelles stratégies d'éradication du virus ou de cure fonctionnelle.

Dans ce contexte de caractérisation des réservoirs viraux, notre premier travail de thèse a permis de décrire de façon quantitative et qualitative l'évolution longitudinale du réservoir chez des patients diagnostiqués et traités rapidement durant la PHI pendant au moins cinq ans sans aucun rebond virologique. Nous avons mis en évidence une diminution rapide et continue des niveaux d'ADN VIH chez ces patients jusqu'à l'atteinte de niveaux très bas, voire même l'indétectabilité au cours du suivi. Plusieurs études randomisées et études de cohortes ont mis en évidence le grand intérêt de l'initiation de la thérapie antirétrovirale dès la PHI afin de limiter la transmission du virus (Rouzioux, Avettand-Fénoël, et Cheret 2017; Hamlyn et al. 2010; Prins et al. 2017) et d'assurer le contrôle virologique rapide de l'infection, la protection et la restauration du système immunitaire ainsi que la limitation de l'amplification du réservoir viral par la régression de la taille du pool lymphocytaire quiescent infecté (Chéret, Bacchus-Souffan, et al. 2015; Karlsson et al. 2001; Hocqueloux et al. 2013; Chéret, Nembot, et al. 2015; Ananworanich et al. 2012; Ambrosioni et al. 2014; Chéret et al. 2017; Thornhill et al. 2014). Nous avons montré qu'à la fin de notre période d'étude (5 ans), 70% des patients avaient une CV ADN VIH indétectable. Ce résultat est concordant avec celui publié par Hocqueloux et ses collaborateurs chez des patients traités rapidement durant les phases précoces de l'infection et durant au moins 7 ans (Hocqueloux et al. 2013). Une 115

différence significative de la taille du réservoir viral a été également décrite lors de la comparaison de la CV ADN VIH total entre des patients traités durant les phases précoces de l'infection et ceux traités durant la phase chronique (Pires et al. 2004). Buzon et ses collaborateurs ont rapporté que la diminution du réservoir au niveau des PBMC était plus prononcée lorsque le traitement a été commencé pendant la PHI (Buzon, Martin-Gayo, et al. 2014). Dans une cohorte suisse, la diminution de la CV ADN VIH est estimée à 1,9 log₁₀ copies/10⁶ PBMC en 18 mois chez des patients traités durant les trois premiers mois de l'infection (Gianella et al. 2011). Les avantages virologiques de l'initiation précoce de la thérapie antirétrovirale ont été confirmés dans plusieurs autres études indiquant une taille du réservoir nettement plus petite chez les PVVIH traités en PHI par rapport à ceux traités tardivement (Koelsch et al. 2011; Strain et al. 2005; Laanani et al. 2015). Cependant, la réduction importante de la taille du réservoir chez des patients traités en PHI ne permet pas l'éradication complète du virus surtout au niveau des sites sanctuaires. L'arrêt du traitement même initié très tôt se traduit par un rebond virologique, une réactivation de l'infection et une expansion des réservoirs viraux avec un risque accru de morbidité et de mortalité (Lillo et al. 2002; T.-W. Chun et al. 2010; Steingrover et al. 2008; Hamlyn et al. 2012). Ces données combinées avec celles de l'échec des protocoles d'interruption thérapeutique chez des patients traités au cours des différents stades de l'infection (Lau et al. 2019; Wen, Bar, et Li 2018) confirment l'intérêt majeur de mieux caractériser les réservoirs latents et le besoin rapide de développer de nouveaux protocoles de cure fonctionnelle afin d'éviter le maintien des ARTs à vie.

La caractérisation de la diversité génétique intra-individuelle du VIH-1 est primordiale afin de comprendre les effets des ARTs sur la réplication virale, les mécanismes de la persistance du réservoir et l'efficacité des nouvelles stratégies d'éradication du virus.

Nous avons montré l'absence de la diversité virale chez des patients traités rapidement pendant la PHI et en succès virologique (sans aucun rebond) durant au moins cinq ans. Les différentes séquences obtenues, au cours du suivi longitudinal, de nos patients étaient entremêlées et homogènes sans aucune preuve de ségrégation ou de changement génétique du virus au cours du temps. Ainsi, nous avons présenté pour la première fois l'absence d'arguments en faveur de l'évolution et de la diversité virale chez des patients adultes traités précocement et en suppression virologique totale pendant plusieurs années. Nos résultats peuvent être expliqués par la faible diversité virale au cours de la PHI. Les populations virales au moment de l'infection aigue ont été décrites comme étant homogènes, résultants de la transmission d'un seul variant viral ou, moins fréquemment hétérogènes résultant de la transmission de plusieurs variants (Keele et al. 2008; M. Kearney et al. 2009). Les ARTs débutés rapidement en PHI bloquent les nouveaux cycles de réplication réduisant ainsi la production et la naissance de nouveaux virus différents de ceux contractés lors de la contamination (Perelson et al. 1997; Besson et al. 2014). Nos données soutiennent l'hypothèse du mécanisme de la persistance et du maintien du réservoir viral grâce à la prolifération des LT CD4 infectés chez les patients traités, malgré une thérapie antirétrovirale efficace. Nos résultats sont concordants avec ceux rapportés par Van Zyl et ses collaborateurs qui ont analysé longitudinalement les différentes populations virales chez dix enfants infectés par le VIH-1 pendant la période périnatale. Huit enfants ont commencé le traitement antirétroviral au cours des dix premiers mois de l'infection et ont été en suppression virologique pendant au moins 7 ans. Deux enfants ont eu une virémie non contrôlée pendant quinze et trente mois, respectivement, avant la suppression virologique. Ces deux derniers patients ont servi de témoins positifs pour la réplication et l'évolution virale. Les auteurs n'ont trouvé aucune preuve d'augmentation de la diversité du virus et aucun changement phylogénétique dans la population provirale chez les huit enfants bien contrôlés. Des preuves claires de l'évolution du virus chez les deux enfants non contrôlés virologiquement ont été mis en évidence. Van Zyl et ses collègues réfutent alors l'hypothèse du maintien du réservoir viral par des cycles de réplication continue sous ARTs (Van Zyl et al. 2017). Une autre étude de Kearney et al. a analysé la variation et la divergence génétique du VIH-1 dans le plasma de quatorze patients avant l'instauration des ARTs, pendant la suppression virologique sous ARTs et après un rebond virologique. Les mesures de la diversité intra-population n'ont révélé aucune preuve significative de la variation génétique globale chez ces patients traités pendant au moins quinze ans. Malgré le rebond virologique chez cinq patients suite à une interruption thérapeutique, les virus séquencés présentaient peu de divergence par rapport aux virus préthérapeutique. Les auteurs concluent l'absence d'évolution virale et que l'apparition de populations virales génétiquement uniformes et l'absence de divergence après une interruption des ARTs fournissent des preuves solides que le VIH-1 persiste longtemps dans les cellules infectées. Certaines de ces cellules, notamment les LT CD4, peuvent être capable de prolifération en absence de cycles de réplication virale (M. F. Kearney et al. 2014). Chaillon et *al.* se sont intéressés également au mécanisme de la persistance d'une virémie résiduelle pendant le traitement antirétroviral. Ils ont supposé que l'intensification du traitement pourrait avoir un impact sur cette virémie résiduelle si elle est liée à des cycles de réplication continue. Ils ont inclus 18 patients suivis pendant une durée médiane de 107 semaines. Neuf patients ont bénéficié d'une intensification thérapeutique avec du MVC dans les 90 jours suivant l'infection.

Le séquençage haut débit de la boucle V3 et des régions gag et pol a été effectué de façon longitudinale dans le plasma et les PBMC. Tous les participants présentaient une virémie résiduelle de faible niveau (médiane de 2,8 copies /ml). Aucune preuve claire d'évolution virale au cours du traitement et aucune différence significative de la diversité virale ou de changement de la structure de la population virale n'a été rapporté dans les deux groupes des patients (Chaillon et al. 2018). Toutes ces données confirment nos résultats stipulant que la virémie résiduelle au cours d'une thérapie virale efficace et la persistance du réservoir viral sont dus à une prolifération clonale des cellules infectées (Gall et al. 2013; Vancoillie et al. 2017; G. van Zyl, Bale, et Kearney 2018; Simonetti et Kearney 2015; Bale et Kearney 2019; Capoferri et al. 2019).

En revanche, ces résultats sont en contradiction avec ceux de certaines études suggérant que le maintien du réservoir viral est dû à des cycles de réplication virale continue malgré une thérapie antirétrovirale efficace (Persaud et al. 2004; Fletcher et al. 2014; Lorenzo-Redondo et al. 2016). Lorenzo-Redondo et *al.* ont séquencé de façon longitudinale pendant six mois les régions gag et pol des virus pré-thérapeutique dans le plasma et dans l'ADN des PBMC et des ganglions lymphatiques inguinaux chez trois patients. Deux patients étaient naïfs d'ARTs et avaient une CVp < 48 copies/ml à partir du troisième mois du traitement et un patient infecté de façon chronique et ayant reçu plusieurs lignes thérapeutiques a continué d'avoir une virémie plasmatique au bout de 6 mois du nouveau traitement antirétroviral instauré. Les auteurs ont rapporté la divergence des séquences virales au cours du temps dans le sang périphérique et les tissus lymphoïdes chez les trois patients. Ils ont conclu que les sites de sanctuaires anatomiques tels que les LN peuvent permettre une réplication virale continue malgré une thérapie efficace, ce qui contribue au maintien du réservoir viral (Lorenzo-

Redondo et al. 2016). Ces résultats ont suscité plusieurs commentaires surtout de la part de Kearney et *al.* qui ont souligné le nombre très faible de patients et la courte durée d'étude. Kearney et ses collègues ont ré-analysé, avec d'autres méthodes d'analyses bioinformatiques, les données publiées par Lorenzo-Redondo et ont rapporté l'absence de preuve significative d'évolution virale (M. F. Kearney et al. 2017).

Ces résultats controversés peuvent être expliqués par l'hétérogénéité des populations étudiées (patients en PHI, enfants traités en PHI, patients en phase chronique de la maladie, etc), de la nature des prélèvements (plasma, ADN du VIH dans les PBMC, ADN du VIH au niveau des LN) et de la divergence des techniques de séquençage (séquençage de Sanger, Séquençage du génome unique, UDS : 454 Roche et technologie Illumina) ainsi que les méthodes d'analyse (analyse phylogénétique, mesure de l'APD, test de panmixie et autres méthodes mathématiques, etc).

D'autres investigations sont nécessaires afin d'approfondir nos connaissances sur le réservoir viral et son mécanisme de maintien à long terme dans le but de mieux optimiser les nouvelles stratégies d'interventions contre l'infection par le VIH. La majorité des études décrites auparavant étaient conduites au niveau du sang périphérique. Cependant, il est nécessaire de mieux comprendre la diversité virale au niveau des différents compartiments de l'organisme car leur contribution dans le maintien de l'infection est inégale. Il s'agit du phénomène de compartimentation caractérisé par des populations virales distinctes dans les différents tissus de l'organisme suggérant la présence d'une barrière biologique et anatomique qui restreint le flux de particules virales ou des cellules infectées. L'étude de la compartimentation peut se faire avec des analyses phylogénétiques ou par la comparaison des profils de mutations de résistance des différentes souches virales présentes dans les différents compartiments.

Dans le cadre de notre deuxième travail de thèse, nous nous sommes intéressés à la compartimentation entre le sang périphérique et le SNC. Nous avons montré pour la première fois que le profil des mutations de résistance aux INSTIs, largement utilisés en pratique clinique, est comparable au niveau du plasma et du LCR chez des patients virémiques. Un seul patient avait un profil de résistance différent entre les deux compartiments avec une mutation E138K associée à la mutation L74I présente seulement au niveau plasmatique. Nous avons supposé qu'il s'agissait probablement du même virus au niveau périphérique et central

dû à un passage passif à travers la barrière hémato-encéphalique (BHE) chez ces patients non contrôlés virologiquement. Nous avons confirmé notre hypothèse avec une analyse phylogénétique montrant l'absence de preuve de variabilité génétique intra-individuelle des différentes sous-populations virales au niveau sanguin et du SNC. Nos résultats sont concordants avec ceux de Soulié et al. qui, dans le cadre d'une étude multicentrique, ont comparé le profil des mutations de résistance sur les gènes de la RT et de la PR dans le plasma et le LCR chez 244 patients présentant des troubles neurocognitifs. Les auteurs ont décrit une concordance des profils de mutations de résistance entre les deux compartiments chez 95,5 % et 98,9 % des 89 patients non traités sur les gènes de la RT et de la PR respectivement. La détection de mutations isolées dans le LCR de ces patients était égale à 2,2 % et 1,1 % sur le gène de la RT et de la PR respectivement. Certaines mutations de résistance étaient également présentes dans le plasma seulement chez 2,2 % des patients non traités sur le gène de la RT. Chez les 155 patients traités, 12,5 % et 19,8 % de mutations ont été détectées dans le LCR seulement sur le gène de la RT et de la PR respectivement. Certains de ces patients présentaient également des mutations dans le plasma et non dans le LCR (10,5% et 13,9 % sur le gène de la RT et de la PR respectivement) (Soulie et al. 2015). Cependant, Venturi et al. qui ont comparé les séquences des gènes de la RT et de la PR dans le plasma et le LCR chez 24 adultes, présentant des symptômes d'atteinte du SNC, ont mis en évidence des profils de mutations de résistance différents entre les deux compartiments chez la plupart des patients. Les auteurs ont conclu à une évolution indépendante des quasi-espèces virales au niveau du plasma et du LCR soulevant la question de la compartimentation au niveau du SNC (Venturi et al. 2000). Dans une autre étude de comparaison des séquences du gène de la RT entre le sang périphérique et le compartiment central chez 23 patients, 9 % et 11 % des mutations de résistance ont été détectées seulement au niveau du plasma et du LCR respectivement. Ces résultats suggèrent une évolution divergente du VIH-1 dans les deux compartiments (Stingele et al. 2001). La présence isolée des mutations de résistance sur le gène de la RT et de la PR peut être expliquée par les propriétés pharmacocinétiques des ARTs ciblant ces deux gènes. La BHE réduit le passage des ARTs, mais la capacité de pénétration des différentes molécules au niveau du SNC est dépendante de plusieurs facteurs tels que l'intégrité de la BHE (inflammation, effraction, etc), les paramètres physico-chimiques des ARTs (PM, liposolubilité, ionisation, etc) ainsi que leurs paramètres pharmacocinétiques (demi-vie, liaison aux protéines plasmatiques, etc). L'AZT, le d4T, le 3TC, l'ABC, la NVP atteignent des concentrations très importantes au niveau du LCR tandis que d'autres INTIs, INNTIs et IPs pénètrent moins dans ce compartiment. Des concentrations sous-optimales des ARTs dans le LCR peuvent favoriser une réplication virale in situ et la sélection de mutants résistants différents de ceux sélectionnés au niveau plasmatique (Antinori et al. 2005; Avedissian et al. 2020). Concernant les INSTIs, le RAL a une bonne pénétration dans le LCR, en revanche celle du DTG et du BIC est faible. Les données de pénétration du CAB injectable sont encore limitées (Avedissian et al. 2020).

La détection de la compartimentation virale n'implique pas nécessairement que les populations dans le LCR et dans le sang soient complètement différentes, mais des souspopulations distinctes peuvent se produire dans chaque compartiment. Nous concluons que la limite de toutes ces études est la technique du séquençage utilisée qui est le séquençage Sanger. Effectivement, la divergence des profils des mutations de résistance entre les deux compartiments périphérique et central peut être sous-estimée à cause de la sensibilité de cette technique dans la détection des variants résistants au sein de toutes les quasi-espèces (détection de 20% des variants résistants) alors que le séquençage UDS a une meilleure sensibilité pour la détection des mutations de résistance (détection jusqu'à 1% des variants résistants) (Rodriguez et al. 2018).

L'analyse plus poussée et plus fine de la compartimentation peut être faite avec l'analyse phylogénétique en comparant les différentes séquences virales dans les différents compartiments. La divergence des quasi-espèces entre le plasma et le LCR a été montrée dans plusieurs études se basant sur des analyses phylogénétiques et des algorithmes mathématiques et a été associée avec des troubles neurodégénératifs (Stefic et al. 2017; Pillai et al. 2006; Schnell et al. 2010; Evering et al. 2014; Sturdevant et al. 2015; Bale et Kearney 2019). Oliveira et ses collaborateurs se sont intéressés à cette question de compartimentation chez 16 patients dont 9 ont été diagnostiqués et traités en PHI. La durée médiane du traitement était de 2,6 ans. Les participants ont atteint la suppression virale après une médiane de 76 jours et sont restés avec des CV indétectables pendant tout le suivi. En association avec deux INTIs, 6, 6 et 4 patients ont été traités avec un IP, un INNTI et un INSTI respectivement. Des échantillons de LCR et de sang appariés ont été obtenus au moment de l'inclusion des 16 participants. Deux patients seulement ont accepté d'être prélevés de façon longitudinale (5 et 3 mois après

l'inclusion et 2 mois après la deuxième visite). La quantification de la CV ADN VIH a été réalisée par la technique de la ddPCR et la boucle C2V3 a été séquencé par une technique de séquençage à haut débit. A l'inclusion, 37,5% (6/16) des patients avaient une CV ADN VIH détectable dans le LCR. La boucle C2V3 a pu être amplifiée pour 8 patients dans les deux compartiments. Les auteurs ont décrit une plus faible diversité virale chez les patients traités précocement par rapport à ceux tardivement. Ce résultat confirme l'intérêt de l'initiation des ARTs précocement afin de diminuer la diversité et l'évolution du virus. En revanche, la plupart des patients ont présenté des preuves de compartimentation génétique dans le LCR suggérant que le SNC est permissif pour le virus du VIH-1 à partir des phases très précoces de l'infection et que l'évolution virale peut être indépendante dans les deux compartiments sanguin et central (Oliveira et al. 2017). Dans une autre étude d'une équipe française, le séquençage du gène de l'enveloppe a été effectué à partir d'échantillons appariés de plasma et de LCR chez 9 patients infectés par différents sous-type du VIH-1 et souffrant de divers troubles neurologiques. Une compartimentation significative des populations virales entre le sang et le LCR a été détectée chez 5 des 9 sujets avec la présence de preuve d'évolution virale indépendante au niveau du SNC (Stefic et al. 2017). Dans une étude récente, menée par notre équipe de recherche, nous avons étudié la compartimentation du SNC chez 3 patients décédés d'une probable encéphalopathie à VIH-1. La première patiente, séropositive depuis 10 ans, avaient reçu plusieurs lignes d'ARTs. Le deuxième patient, séropositif depuis 9 ans, n'a jamais été traité et la troisième patiente a été traité, mais nous n'avions aucune donnée sur la date et la durée de l'infection par le VIH-1. Nous avons analysé pour ces patients, 12 biopsies cérébrales correspondant à différentes parties du cerveau (lobe temporal, lobe frontal, le noyau caudé, le thalamus, le cervelet, le bulbe rachidien et la moelle épinière). Nous avons séquencé les gènes de la RT et la boucle C2V3 par séquençage Sanger et par UDS (technique Illumina). Nous avons montré chez tous les patients, la divergence des variants minoritaires intra et inter-régionale. L'analyse des arbres phylogénétiques nous a permis de décrire la séparation et la ségrégation nette des différentes séquences en fonction de la partie du cerveau (surtout au niveau du lobe temporal, du noyau caudé et de la moelle épinière). Nous avons montré la formation de clusters viraux en fonction de la région cérébrale avec très peu de séquences partagées. Cette évolution virale indépendante confirme la compartimentation au niveau du SNC et peut être expliquée par la diffusion inégale des ARTs au niveau des différentes parties du cerveau (Giatsou et al. 2020).

En plus de la complexité génétique intrinsèque du VIH-1 et du phénomène de la compartimentation, certains facteurs de l'hôte, tels que les protéines APOBEC3, jouent un rôle majeur dans la diversité et l'évolution virale au cours des différents stades de l'infection (Simon et al. 2005; E.-Y. Kim et al. 2014). Grâce à leur activité de cytidine désaminase, les APOBEC3 produisent des transitions (G) vers (A) qui conduisent à la production de virus défectifs, avec de nombreux codons stop, dont la capacité réplicative est inhibée (Harris et Liddament 2004; Cullen 2006; Gillick et al. 2013). Ces virus défectifs apparaissent dès les premiers jours de l'infection et bien que les virus intacts semblent majoritaires aux stades très précoces, une majorité de génomes défectifs a été observée un mois après la contamination (Lee et al. 2019). La proportion de ces derniers augmente et s'accumule au cours des différents stades de la maladie, comme en témoigne leur proportion plus élevée chez les patients traités tardivement comparés à ceux traités rapidement au cours des phases précoces suivant la contamination (Hiener et al. 2017; Bruner et al. 2016). Certains virus défectifs ne sont pas « silencieux », ils peuvent être partiellement transcrits voire traduits, ce qui contribue à la pathogenèse du VIH-1 par la stimulation chronique des défenses immunitaires (Imamichi et al. 2016; 2020). Certaines transitions (G) vers (A) peuvent être associées à des mutations de résistances aux différentes classes des ARTs tels que les mutations E138K, M184I, M230I, etc (Mulder, Harari, et Simon 2008; Fourati, Malet, et al. 2012). L'implication clinique, l'impact thérapeutique ainsi que les facteurs associés avec l'apparition de ces mutations de résistances n'ont jamais été étudiés. Ainsi, dans le cadre de notre troisième travail de thèse, nous avons analysé les paramètres cliniques et immuno-virologiques pouvant être associés à des mutations de résistances résultant des transitions (G) vers (A) chez un grand nombre de patients VIH-1 bien contrôlés virologiquement. Nous avons montré pour la première fois l'association significative de l'activité des APOBEC3 avec une taille plus petite du réservoir viral. Ces résultats de la corrélation inverse de l'activité des protéines APOBEC3, exprimée dans notre étude avec des DRAMs, liés aux transitions (G) vers (A), et les codons stop sur le gène de la RT, avec le niveau de l'ADN VIH est concordant avec ceux trouvé par Fourati et al. Les auteurs ont étudié la relation entre la taille du réservoir viral et la fréquence des génomes défectifs dans des échantillons appariés de PBMC et de biopsies rectales chez 5 patients traités avec une CVp indétectable pendant au moins 7 ans. Un groupe contrôle de 5 patients virémiques non traités a été également étudié. La détection des génomes défectifs avec des codons stop était systématique chez les patients traités au niveau du sang périphérique et du tissu rectal, par contre un seul patient non traité avait des codons stop au niveau des PBMC. La quantité de la CV ADN était inversement corrélée avec le niveau des génomes défectifs (Fourati, Lambert-Niclot, et al. 2012). Kourteva et ses collègues ont également étudié la relation entre les niveaux d'ARNm des APOBEC3/F et la CVp et celle de l'ADN chez 19 patients naïfs d'ARTs (12 patients étaient HIC). Les auteurs ont montré que les HIC avaient une CV provirale plus basse que les patients virémiques et que cette CV était associée avec des niveaux très élevés d'ARNm de l'APOBEC3G, suggérant que des niveaux d'expression élevés de l'activité des APOBEC3 pourrait contribuer à un contrôle spontané de la virémie chez certains patients (Kourteva et al. 2012). Ce résultat de corrélation inversée entre les APOBEC3 et la taille du réservoir viral pourrait s'expliquer par les activités intrinsèques de ces apolipoprotéines, détaillées précédemment. En effet, ces enzymes cellulaires bloquent la formation de nouveaux provirus par des mécanismes complémentaires, dépendant et/ou indépendant de la cytidine désaminase. La production de transitions (G) vers (A) induit la production de provirus défectifs incapables de se multiplier et de donner naissance à de nouveaux virions (Xu, Byun, et Dudley 2020). De plus, ces FRC bloquent la réplication virale suite à leur interférence avec l'activité transcriptionnelle précoce du virus (Nowarski et al. 2014). Elles ont aussi la capacité de se fixer directement sur l'ARN génomique, bloquant ainsi la rétrotranscription (Iwatani et al. 2007; Newman et al. 2005; Bishop, Holmes, et Malim 2006). D'autres études plus récentes ont montré que les APOBEC3G/F peuvent se fixer directement sur la TI et déstabiliser son activité de rétrotranscription (Pollpeter et al. 2018; Bieniasz 2018). Les APOBEC3G/F interfèrent aussi avec le transfert de l'ADN viral dans le noyau de l'hôte et déstabilise son processus d'intégration dans le génome de la cellule cible (Mbisa et al. 2007; Mbisa, Bu, et Pathak 2010).

Nous avons aussi montré que la présence de DRAMs liées aux transitions (G) vers (A) et des codons stop est plus fréquente dans les sous-types non-B du VIH-1. Ce résultat pourrait s'expliquer par le polymorphisme des différents composants de la famille des APOBEC3 et

par la diversité génétique de Vif en fonction du sous-type viral. Par un même mécanisme de dégradation protéasomique, ce facteur d'infectivité viral induit la dégradation de ces FRC et prévient ainsi les hypermutations et le blocage du cycle de la réplication du virus. Cependant, la variabilité génétique des séquences protéiques de Vif induit une inhibition inégale des APOBEC3 en fonction du sous-type viral (Binka et al. 2012; Lisovsky et al. 2013; Iwabu et al. 2010). Binka et ses collaborateurs ont constaté, par des études de clonage et de culture cellulaire, que Vif est plus efficace et plus neutralisant sur les apolipoprotéines des souches de sous-type non B. Les souches de sous-type F (surtout F1 et F3) avaient une prédominance d'activité sur APOBEC3H (Binka et al. 2012). Une autre équipe de chercheurs a étudié l'impact de Vif sur l'APOBEC3G en fonction de différents sous-type viraux et ont constaté que ce facteur d'infectivité dérivé des virus de sous-type C, était moins efficace dans la neutralisation des APOBEC3G comparés à ceux de sous-type B et de CRF02_AG (Lisovsky et al. 2013). En revanche, ce résultat est différent de celui de Iwabu et al. qui ont comparé l'activité antivirale de Vif (sur la même enzyme : APOBEC3G), en fonction des sous-types viraux A, B, C, CRF01_AE et CRF02_AG, et qui ont décrit que l'activité neutralisante de Vif sur le sous-type C est plus robuste par rapport à celle sur les autres sous-type viraux (Iwabu et al. 2010). La limite majeure de toutes ces études est le nombre des isolats viraux étudiés, qui ne sont pas suffisamment représentatifs de tous les sous-types du VIH-1. Dans notre étude, nous n'avons pas pu analyser la corrélation de l'activité des APOBEC3 avec la taille du réservoir en fonction de chaque sous-type non-B à cause du faible nombre de chaque soustype. D'autres investigations sur un plus grand nombre de prélèvements, sont nécessaires afin de mieux caractériser l'impact réel de Vif sur les différents isolats viraux et prédire l'activité antivirale de Vif en fonction des différentes enzymes APOBEC3 en fonction du sous-type viral.

En conclusion, la persistance du réservoir viral, le phénomène de compartimentation ainsi que la diversité génétique du VIH-1 en fonction de plusieurs paramètres intrinsèques et liés à l'hôte restent des problématiques majeures dans la recherche de stratégies d'éradication du virus ou de rémission fonctionnelle. Caractériser la diversité et l'évolution des populations VIH au sein de l'hôte permet de mieux comprendre les mécanismes de la persistance du VIH malgré une thérapie antirétrovirale efficace. Ce travail de thèse a permis de mieux caractériser qualitativement et quantitativement le réservoir du VIH-1 dans différentes situations cliniques. Nous avons caractérisé de façon longitudinale l'établissement et la diversité du réservoir sanguin chez des patients diagnostiqués et traités rapidement au cours de la PHI. Nos résultats renforcent l'importance de l'initiation rapide de la thérapie antirétrovirale afin de limiter la taille du réservoir et bloquer son évolution au cours du temps, chez des patients contrôlés virologiquement. Nous avons montré pour la première fois, l'absence de différence significative des mutations de résistance aux INSTIs entre le sang périphérique et le LCR, bien que cette comparaison des mutations dans les deux compartiments ne soit pas suffisante pour se prononcer de l'absence d'évolution indépendante des différentes sous-populations virales et de la compartimentation entre le sang périphérique et le SNC. Nous avons également montré la corrélation indépendante entre l'activité des protéines APOBEC3 avec une petite taille du réservoir viral et avec le sous-type non B.

Nos travaux ont apporté de nouvelles données sur le réservoir viral et sa variabilité. Cependant, de nombreuses perspectives de recherche persistent afin de concevoir des stratégies d'interventions d'interruption thérapeutique chez des patients bien contrôlés virologiquement depuis longtemps ainsi que la compréhension de l'impact clinique et thérapeutique des DRAMs liées aux transitions (G) vers (A) dans la vie réelle des PVVIH.

BIBLIOGRAPHIE

Abner, Erik, et Albert Jordan. 2019. «HIV "Shock and Kill" Therapy: In Need of Revision ». *Antiviral Research* 166 (juin): 19- 34. https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2019.03.008.

Abrahem, Rachel, Emerald Chiang, Joseph Haquang, Amy Nham, Yu-Sam Ting, et Vishwanath Venketaraman. 2020. « The Role of Dendritic Cells in TB and HIV Infection ». *Journal of Clinical Medicine* 9 (8). https://doi.org/10.3390/jcm9082661.

Agata, Y., A. Kawasaki, H. Nishimura, Y. Ishida, T. Tsubata, H. Yagita, et T. Honjo. 1996. « Expression of the PD-1 Antigen on the Surface of Stimulated Mouse T and B Lymphocytes ». International Immunology 8 (5): 765-72. https://doi.org/10.1093/intimm/8.5.765.

Ait-Ammar, Amina, Anna Kula, Gilles Darcis, Roxane Verdikt, Stephane De Wit, Virginie Gautier, Patrick W. G. Mallon, Alessandro Marcello, Olivier Rohr, et Carine Van Lint. 2019. « Current Status of Latency Reversing Agents Facing the Heterogeneity of HIV-1 Cellular and Tissue Reservoirs ». *Frontiers in Microbiology* 10: 3060. https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.03060.

Ali, Ayub, Scott G. Kitchen, Irvin S. Y. Chen, Hwee L. Ng, Jerome A. Zack, et Otto O. Yang. 2016. «HIV-1-Specific Chimeric Antigen Receptors Based on Broadly Neutralizing Antibodies ». *Journal of Virology* 90 (15): 6999-7006. https://doi.org/10.1128/JVI.00805-16.

Ambrosioni, Juan, David Nicolas, Omar Sued, Fernando Agüero, Christian Manzardo, et JoseM. Miro. 2014. « Update on Antiretroviral Treatment during Primary HIV Infection ». ExpertReviewofAnti-InfectiveTherapy12(7):793-807.https://doi.org/10.1586/14787210.2014.913981.

Ananworanich, Jintanat, Carlo P. Sacdalan, Suteeraporn Pinyakorn, Nicolas Chomont, Mark de Souza, Tassanee Luekasemsuk, Alexandra Schuetz, et al. 2016. «Virological and Immunological Characteristics of HIV-Infected Individuals at the Earliest Stage of Infection ». *Journal of Virus Eradication* 2: 43-48.

Ananworanich, Jintanat, Alexandra Schuetz, Claire Vandergeeten, Irini Sereti, Mark de Souza, Rungsun Rerknimitr, Robin Dewar, et al. 2012. «Impact of Multi-Targeted Antiretroviral Treatment on Gut T Cell Depletion and HIV Reservoir Seeding during Acute HIV Infection ». *PloS One* 7 (3): e33948. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0033948.

Anderson, Elizabeth M., et Frank Maldarelli. 2018. «Quantification of HIV DNA Using Droplet Digital PCR Techniques ». *Current Protocols in Microbiology* 51 (1): e62. https://doi.org/10.1002/cpmc.62.

Anderson, Jeffrey, Celia Schiffer, Sook-Kyung Lee, et Ronald Swanstrom. 2009. «Viral Protease Inhibitors ». *Handbook of Experimental Pharmacology*, n^o 189: 85-110. https://doi.org/10.1007/978-3-540-79086-0_4.

Ando, Makoto, Minako Ito, Tanakorn Srirat, Taisuke Kondo, et Akihiko Yoshimura. 2020. « Memory T Cell, Exhaustion, and Tumor Immunity ». *Immunological Medicine* 43 (1): 1-9. https://doi.org/10.1080/25785826.2019.1698261.

Antinori, Andrea, Carlo Federico Perno, Maria Letizia Giancola, Federica Forbici, Giuseppe Ippolito, Richard M. Hoetelmans, et Stephen C. Piscitelli. 2005. « Efficacy of Cerebrospinal Fluid (CSF)–Penetrating Antiretroviral Drugs against HIV in the Neurological Compartment: Different Patterns of Phenotypic Resistance in CSF and Plasma ». *Clinical Infectious Diseases* 41 (12): 1787-93. https://doi.org/10.1086/498310.

Augustine, Tracy, Priyanka Chaudhary, Kailash Gupta, Sehbanul Islam, Payel Ghosh, Manas Kumar Santra, et Debashis Mitra. 2017. «Cyclin F/FBXO1 Interacts with HIV-1 Viral Infectivity Factor (Vif) and Restricts Progeny Virion Infectivity by Ubiquitination and Proteasomal Degradation of Vif Protein through SCFcyclin F E3 Ligase Machinery ». *The*

 Journal
 of
 Biological
 Chemistry
 292
 (13):
 5349-63.

 https://doi.org/10.1074/jbc.M116.765842.

Avedissian, Sean N., Shetty Ravi Dyavar, Howard S. Fox, et Courtney V. Fletcher. 2020. « Pharmacologic Approaches to HIV-Associated Neurocognitive Disorders ». *Current Opinion in Pharmacology* 54 (octobre): 102-8. https://doi.org/10.1016/j.coph.2020.09.003.

Avettand-Fenoel, Véronique, Tatiana Bayan, Elise Gardiennet, Faroudy Boufassa, Pauline Lopez, Camille Lecuroux, Nicolas Noel, et al. 2019. « Dynamics in HIV-DNA Levels over Time in HIV Controllers ». *Journal of the International AIDS Society* 22 (1): e25221. https://doi.org/10.1002/jia2.25221.

Avettand-Fenoel, Véronique, Vincent Bouteloup, Adeline Mélard, Catherine Fagard, Marie-Laure Chaix, Pascale Leclercq, Geneviève Chêne, Jean-Paul Viard, Christine Rouzioux, et members of the ETOILE study. 2010. « Higher HIV-1 DNA Associated with Lower Gains in CD4 Cell Count among Patients with Advanced Therapeutic Failure Receiving Optimized Treatment (ANRS 123--ETOILE) ». *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 65 (10): 2212- 14. https://doi.org/10.1093/jac/dkq282.

Avettand-Fènoël, Véronique, Marie-Laure Chaix, Stéphane Blanche, Marianne Burgard, Corinne Floch, Kadidia Toure, Marie-Christine Allemon, Josiane Warszawski, Christine Rouzioux, et French Pediatric Cohort Study ANRS-CO 01 Group. 2009. « LTR Real-Time PCR for HIV-1 DNA Quantitation in Blood Cells for Early Diagnosis in Infants Born to Seropositive Mothers Treated in HAART Area (ANRS CO 01) ». *Journal of Medical Virology* 81 (2): 217-23. https://doi.org/10.1002/jmv.21390.

Avettand-Fènoël, Véronique, Laurent Hocqueloux, Jade Ghosn, Antoine Cheret, Pierre Frange, Adeline Melard, Jean-Paul Viard, et Christine Rouzioux. 2016. « Total HIV-1 DNA, a Marker of Viral Reservoir Dynamics with Clinical Implications ». *Clinical Microbiology Reviews* 29 (4): 859- 80. https://doi.org/10.1128/CMR.00015-16.

Badia, Roger, Ester Ballana, Marc Castellví, Edurne García-Vidal, Maria Pujantell, Bonaventura Clotet, Julia G. Prado, et al. 2018. « CD32 Expression Is Associated to T-Cell Activation and Is Not a Marker of the HIV-1 Reservoir ». *Nature Communications* 9 (1): 2739. https://doi.org/10.1038/s41467-018-05157-w.

Bailon, Lucia, Beatriz Mothe, Lance Berman, et Christian Brander. 2020. «Novel Approaches Towards a Functional Cure of HIV/AIDS ». *Drugs* 80 (9): 859-68. https://doi.org/10.1007/s40265-020-01322-y.

Bale, Michael J., et Mary F. Kearney. 2019. «Review: HIV-1 Phylogeny during Suppressive Antiretroviral Therapy ». *Current Opinion in HIV and AIDS* 14 (3): 188-93. https://doi.org/10.1097/COH.0000000000535.

Banga, Riddhima, Caterina Rebecchini, Francesco Andrea Procopio, Alessandra Noto, Olivia Munoz, Kalliopi Ioannidou, Craig Fenwick, et al. 2019. « Lymph Node Migratory Dendritic Cells Modulate HIV-1 Transcription through PD-1 Engagement ». *PLoS Pathogens* 15 (7): e1007918. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007918.

Barré-Sinoussi, F., J. C. Chermann, F. Rey, M. T. Nugeyre, S. Chamaret, J. Gruest, C. Dauguet, et al. 1983. « Isolation of a T-Lymphotropic Retrovirus from a Patient at Risk for Acquired Immune Deficiency Syndrome (AIDS) ». *Science (New York, N.Y.)* 220 (4599): 868-71. https://doi.org/10.1126/science.6189183.

Belmonte, Liliana, Martin Olmos, Ana Fanin, Cecilia Parodi, Patricia Baré, Hugo Concetti, Héctor Pérez, Maria Marta E. de Bracco, et Pedro Cahn. 2007. « The Intestinal Mucosa as a Reservoir of HIV-1 Infection after Successful HAART ». *AIDS (London, England)* 21 (15): 2106- 8. https://doi.org/10.1097/QAD.0b013e3282efb74b.

Bertagnolli, Lynn N., Jennifer A. White, Francesco R. Simonetti, Subul A. Beg, Jun Lai, Costin Tomescu, Alexandra J. Murray, et al. 2018. «The Role of CD32 during HIV-1 Infection ». *Nature* 561 (7723): E17- 19. https://doi.org/10.1038/s41586-018-0494-3.

Besson, Guillaume J., Christina M. Lalama, Ronald J. Bosch, Rajesh T. Gandhi, Margaret A. Bedison, Evgenia Aga, Sharon A. Riddler, Deborah K. McMahon, Feiyu Hong, et John W. Mellors. 2014. «HIV-1 DNA Decay Dynamics in Blood during More than a Decade of Suppressive Antiretroviral Therapy ». *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America* 59 (9): 1312-21. https://doi.org/10.1093/cid/ciu585.

Bieniasz, Paul D. 2018. « A Multimodal Antiretroviral Protein ». *Nature Microbiology* 3 (2): 122-23. https://doi.org/10.1038/s41564-017-0104-4.

Binka, Mawuena, Marcel Ooms, Myeika Steward, et Viviana Simon. 2012. « The Activity Spectrum of Vif from Multiple HIV-1 Subtypes against APOBEC3G, APOBEC3F, and APOBEC3H ». *Journal of Virology* 86 (1): 49- 59. https://doi.org/10.1128/JVI.06082-11.

Bishop, Kate N., Rebecca K. Holmes, et Michael H. Malim. 2006. « Antiviral Potency of APOBEC Proteins Does Not Correlate with Cytidine Deamination ». *Journal of Virology* 80 (17): 8450-58. https://doi.org/10.1128/JVI.00839-06.

Blankson, Joel N., Deborah Persaud, et Robert F. Siliciano. 2002. « The Challenge of Viral Reservoirs in HIV-1 Infection ». *Annual Review of Medicine* 53: 557-93. https://doi.org/10.1146/annurev.med.53.082901.104024.

Bobbin, Maggie L, John C Burnett, et John J Rossi. 2015. « RNA interference approaches for treatment of HIV-1 infection ». *Genome Medicine* 7 (1). https://doi.org/10.1186/s13073-015-0174-y.

Boufassa, F., C. Bachmeyer, N. Carré, C. Deveau, A. Persoz, C. Jadand, D. Séréni, et D. Bucquet. 1995. «Influence of Neurologic Manifestations of Primary Human Immunodeficiency Virus Infection on Disease Progression. SEROCO Study Group ». *The Journal of Infectious Diseases* 171 (5): 1190- 95. https://doi.org/10.1093/infdis/171.5.1190.

Boullé, Charlotte, François Rouet, Patricia Fassinou, Philippe Msellati, Pierre Debeaudrap, Marie-Laure Chaix, Christine Rouzioux, et Véronique Avettand-Fenoel. 2014. « HIV-1 DNA 131 Concentrations and Evolution among African HIV-1-Infected Children under Antiretroviral Treatment (ANRS 1244/1278) ». *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 69 (11): 3047-50. https://doi.org/10.1093/jac/dku274.

Bourry, Olivier, Abdelkrim Mannioui, Pierre Sellier, Camille Roucairol, Lucie Durand-Gasselin, Nathalie Dereuddre-Bosquet, Henri Benech, Pierre Roques, et Roger Le Grand. 2010. « Effect of a Short-Term HAART on SIV Load in Macaque Tissues Is Dependent on Time of Initiation and Antiviral Diffusion ». *Retrovirology* 7 (septembre): 78. https://doi.org/10.1186/1742-4690-7-78.

Bracq, Lucie, Maorong Xie, Marie Lambelé, Lan-Trang Vu, Julie Matz, Alain Schmitt, Jérôme Delon, et al. 2017. «T Cell-Macrophage Fusion Triggers Multinucleated Giant Cell Formation for HIV-1 Spreading ». *Journal of Virology* 91 (24). https://doi.org/10.1128/JVI.01237-17.

Brenchley, Jason M., Brenna J. Hill, David R. Ambrozak, David A. Price, Francisco J. Guenaga, Joseph P. Casazza, Janaki Kuruppu, et al. 2004. «T-Cell Subsets That Harbor Human Immunodeficiency Virus (HIV) in Vivo: Implications for HIV Pathogenesis ». *Journal of Virology* 78 (3): 1160- 68. https://doi.org/10.1128/jvi.78.3.1160-1168.2004.

Bruner, Katherine M., Alexandra J. Murray, Ross A. Pollack, Mary G. Soliman, Sarah B. Laskey, Adam A. Capoferri, Jun Lai, et al. 2016. « Defective Proviruses Rapidly Accumulate during Acute HIV-1 Infection ». *Nature Medicine* 22 (9): 1043-49. https://doi.org/10.1038/nm.4156.

Bruner, Katherine M., Zheng Wang, Francesco R. Simonetti, Alexandra M. Bender, Kyungyoon J. Kwon, Srona Sengupta, Emily J. Fray, et al. 2019. « A Quantitative Approach for Measuring the Reservoir of Latent HIV-1 Proviruses ». *Nature* 566 (7742): 120-25. https://doi.org/10.1038/s41586-019-0898-8. Brussel, Audrey, Olivier Delelis, et Pierre Sonigo. 2005. «Alu-LTR Real-Time Nested PCR Assay for Quantifying Integrated HIV-1 DNA ». *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 304: 139- 54. https://doi.org/10.1385/1-59259-907-9:139.

Brussel, Audrey, et Pierre Sonigo. 2004. « Evidence for Gene Expression by Unintegrated Human Immunodeficiency Virus Type 1 DNA Species ». *Journal of Virology* 78 (20): 11263-71. https://doi.org/10.1128/JVI.78.20.11263-11271.2004.

Buzon, Maria J., Enrique Martin-Gayo, Florencia Pereyra, Zhengyu Ouyang, Hong Sun, Jonathan Z. Li, Michael Piovoso, et al. 2014. « 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 ». *Journal of Virology* 88 (17): 10056-65. https://doi.org/10.1128/JVI.01046-14.

Buzon, Maria J., Hong Sun, Chun Li, Amy Shaw, Katherine Seiss, Zhengyu Ouyang, Enrique Martin-Gayo, et al. 2014. «HIV-1 Persistence in CD4+ T Cells with Stem Cell-like Properties ». *Nature Medicine* 20 (2): 139- 42. https://doi.org/10.1038/nm.3445.

Capoferri, Adam A., Michael J. Bale, Francesco R. Simonetti, et Mary F. Kearney. 2019. « Phylogenetic Inference for the Study of Within-Host HIV-1 Dynamics and Persistence on Antiretroviral Therapy ». *The Lancet. HIV* 6 (5): e325-33. https://doi.org/10.1016/S2352-3018(19)30051-7.

Cardelli, Maurizio. 2011. « Alu PCR ». *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 687: 221-29. https://doi.org/10.1007/978-1-60761-944-4_15.

Carter, Natalie J., et Gillian M. Keating. 2007. « Maraviroc ». *Drugs* 67 (15): 2277-88; discussion 2289-2290. https://doi.org/10.2165/00003495-200767150-00010.

Casabianca, Anna, Chiara Orlandi, Benedetta Canovari, Maddalena Scotti, Marcello Acetoso, Massimo Valentini, Enzo Petrelli, et Mauro Magnani. 2014. « A Real Time PCR Platform for the Simultaneous Quantification of Total and Extrachromosomal HIV DNA Forms in Blood of HIV-1 Infected Patients ». *PLoS ONE* 9 (11). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0111919.

Cashin, Kieran, Geza Paukovics, Martin R. Jakobsen, Lars Østergaard, Melissa J. Churchill, Paul R. Gorry, et Jacqueline K. Flynn. 2014. « Differences in Coreceptor Specificity Contribute to Alternative Tropism of HIV-1 Subtype C for CD4(+) T-Cell Subsets, Including Stem Cell Memory T-Cells ». *Retrovirology* 11 (novembre): 97. https://doi.org/10.1186/s12977-014-0097-5.

Castro-Gonzalez, Sergio, Marta Colomer-Lluch, et Ruth Serra-Moreno. 2018. « Barriers for HIV Cure: The Latent Reservoir ». *AIDS Research and Human Retroviruses* 34 (9): 739-59. https://doi.org/10.1089/AID.2018.0118.

Catalfamo, Marta, Cecile Le Saout, et H. Clifford Lane. 2012. « The Role of Cytokines in the Pathogenesis and Treatment of HIV Infection ». *Cytokine & Growth Factor Reviews* 23 (4-5): 207-14. https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2012.05.007.

Chahroudi, Ann, Guido Silvestri, et Mathias Lichterfeld. 2015. «T Memory Stem Cells and HIV: A Long-Term Relationship ». *Current HIV/AIDS Reports* 12 (1): 33-40. https://doi.org/10.1007/s11904-014-0246-4.

Chaillon, Antoine, Sara Gianella, Steven M. Lada, Josué Perez-Santiago, Parris Jordan, Caroline Ignacio, Maile Karris, et al. 2018. « Size, Composition, and Evolution of HIV DNA Populations during Early Antiretroviral Therapy and Intensification with Maraviroc ». *Journal of Virology* 92 (3): e01589-17. https://doi.org/10.1128/JVI.01589-17.

Chan, Chi N., Benjamin Trinité, Caroline S. Lee, Saurabh Mahajan, Akanksha Anand, Dominik Wodarz, Steffanie Sabbaj, Anju Bansal, Paul A. Goepfert, et David N. Levy. 2016. « HIV-1 Latency and Virus Production from Unintegrated Genomes Following Direct Infection of Resting CD4 T Cells ». *Retrovirology* 13 (janvier): 1. https://doi.org/10.1186/s12977-015-0234-9. Chéret, Antoine, Charline Bacchus-Souffan, Veronique Avettand-Fenoël, Adeline Mélard, Georges Nembot, Catherine Blanc, Assia Samri, et al. 2015. « Combined ART Started during Acute HIV Infection Protects Central Memory CD4+ T Cells and Can Induce Remission ». *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 70 (7): 2108-20. https://doi.org/10.1093/jac/dkv084.

Chéret, Antoine, Christine Durier, Adeline Mélard, Mickaël Ploquin, Julia Heitzmann, Camille Lécuroux, Véronique Avettand-Fenoël, et al. 2017. « Impact of Early CART on HIV Blood and Semen Compartments at the Time of Primary Infection ». *PloS One* 12 (7): e0180191. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0180191.

Chéret, Antoine, Georges Nembot, Adeline Mélard, Caroline Lascoux, Laurence Slama, Patrick Miailhes, Patrick Yeni, et al. 2015. «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 ». *The Lancet. Infectious Diseases* 15 (4): 387-96. https://doi.org/10.1016/S1473-3099(15)70021-6.

Chomont, Nicolas, Mohamed El-Far, Petronela Ancuta, Lydie Trautmann, Francesco A. Procopio, Bader Yassine-Diab, Geneviève Boucher, et al. 2009. «HIV Reservoir Size and Persistence Are Driven by T Cell Survival and Homeostatic Proliferation ». *Nature Medicine* 15 (8): 893- 900. https://doi.org/10.1038/nm.1972.

Chun, T. W., D. Engel, M. M. Berrey, T. Shea, L. Corey, et A. S. Fauci. 1998. « Early Establishment of a Pool of Latently Infected, Resting CD4(+) T Cells during Primary HIV-1 Infection ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95 (15): 8869-73. https://doi.org/10.1073/pnas.95.15.8869.

Chun, Tae-Wook, J. Shawn Justement, Danielle Murray, Claire W. Hallahan, Janine Maenza, Ann C. Collier, Prameet M. Sheth, et al. 2010. «Rebound of plasma viremia following cessation of antiretroviral therapy despite profoundly low levels of HIV reservoir: implications for eradication ». *AIDS (London, England)* 24 (18): 2803-8. https://doi.org/10.1097/QAD.0b013e328340a239.

Clavel, F., D. Guétard, F. Brun-Vézinet, S. Chamaret, M. A. Rey, M. O. Santos-Ferreira, A.
G. Laurent, C. Dauguet, C. Katlama, et C. Rouzioux. 1986. « Isolation of a New Human Retrovirus from West African Patients with AIDS ». *Science (New York, N.Y.)* 233 (4761): 343-46. https://doi.org/10.1126/science.2425430.

Cohen, Myron S., George M. Shaw, Andrew J. McMichael, et Barton F. Haynes. 2011. « Acute HIV-1 Infection ». *The New England journal of medicine* 364 (20): 1943-54. https://doi.org/10.1056/NEJMra1011874.

Cohn, Lillian B., Nicolas Chomont, et Steven G. Deeks. 2020. « The Biology of the HIV-1 Latent Reservoir and Implications for Cure Strategies ». *Cell Host & Microbe* 27 (4): 519-30. https://doi.org/10.1016/j.chom.2020.03.014.

Colby, Donn J., Lydie Trautmann, Suteeraporn Pinyakorn, Louise Leyre, Amélie Pagliuzza, Eugène Kroon, Morgane Rolland, et al. 2018. « Rapid HIV RNA Rebound after Antiretroviral Treatment Interruption in Persons Durably Suppressed in Fiebig I Acute HIV Infection ». *Nature Medicine* 24 (7): 923- 26. https://doi.org/10.1038/s41591-018-0026-6.

Collins, David R., Gaurav D. Gaiha, et Bruce D. Walker. 2020. «CD8+ T Cells in HIV Control, Cure and Prevention ». *Nature Reviews*. *Immunology* 20 (8): 471-82. https://doi.org/10.1038/s41577-020-0274-9.

Collins S., HIV pipeline 2020: new drugs in development. 2020. « https://i-base.info/htb/wp-content/uploads/2020/03/i-Base-HIV-pipeline-March-2020.pdf », mars 2020.

Cook, Michael R., et Chul Kim. 2019. « Safety and Efficacy of Immune Checkpoint Inhibitor Therapy in Patients With HIV Infection and Advanced-Stage Cancer: A Systematic Review ». *JAMA Oncology* 5 (7): 1049- 54. https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2018.6737.

Coombs, Robert W., Patricia S. Reichelderfer, et Alan L. Landay. 2003. «Recent Observations on HIV Type-1 Infection in the Genital Tract of Men and Women ». *AIDS* (*London, England*) 17 (4): 455- 80. https://doi.org/10.1097/00002030-200303070-00001.

Costin, Joshua M. 2007. « Cytopathic Mechanisms of HIV-1 ». *Virology Journal* 4 (octobre): 100. https://doi.org/10.1186/1743-422X-4-100.

Council, Olivia D., et Sarah B. Joseph. 2018. « Evolution of Host Target Cell Specificity During HIV-1 Infection ». *Current HIV Research* 16 (1): 13-20. https://doi.org/10.2174/1570162X16666171222105721.

Cullen, Bryan R. 2006. «Role and Mechanism of Action of the APOBEC3 Family of Antiretroviral Resistance Factors». *Journal of Virology* 80 (3): 1067-76. https://doi.org/10.1128/JVI.80.3.1067-1076.2006.

D Urbano, Vanessa, Elisa De Crignis, et Maria Carla Re. 2018. «Host Restriction Factors and Human Immunodeficiency Virus (HIV-1): A Dynamic Interplay Involving All Phases of the Viral Life Cycle ». *Current HIV Research* 16 (3): 184-207. https://doi.org/10.2174/1570162X16666180817115830.

Dalgleish, Angus G., Peter C. L. Beverley, Paul R. Clapham, Dorothy H. Crawford, Melvyn F. Greaves, et Robin A. Weiss. 1984. « The CD4 (T4) Antigen Is an Essential Component of the Receptor for the AIDS Retrovirus ». *Nature* 312 (5996): 763-67. https://doi.org/10.1038/312763a0.

Darcis, Gilles, Benoît Van Driessche, et Carine Van Lint. 2016. « Preclinical Shock Strategies to Reactivate Latent HIV-1: An Update ». *Current Opinion in HIV and AIDS* 11 (4): 388-93. https://doi.org/10.1097/COH.0000000000288.

Day, Cheryl L., Daniel E. Kaufmann, Photini Kiepiela, Julia A. Brown, Eshia S. Moodley, Sharon Reddy, Elizabeth W. Mackey, et al. 2006. « PD-1 Expression on HIV-Specific T Cells Is Associated with T-Cell Exhaustion and Disease Progression ». *Nature* 443 (7109): 350-54. https://doi.org/10.1038/nature05115.

De Rossi, Anita, A. Sarah Walker, Davide De Forni, Diana M. Gibb, et Paediatric European Network for Treatment of AIDS (PENTA). 2002. « Biphasic Decay of Cell-Associated HIV-1

DNA in HIV-1-Infected Children on Antiretroviral Therapy ». *AIDS (London, England)* 16 (14): 1961-63. https://doi.org/10.1097/00002030-200209270-00015.

Delelis, Olivier, Kevin Carayon, Ali Saïb, Eric Deprez, et Jean-François Mouscadet. 2008. « Integrase and Integration: Biochemical Activities of HIV-1 Integrase ». *Retrovirology* 5 (décembre): 114. https://doi.org/10.1186/1742-4690-5-114.

Delgado, Rafael. 2008. « [Mechanisms of resistance and failure of treatment with maraviroc] ». *Enfermedades Infecciosas Y Microbiologia Clinica* 26 Suppl 11 (octobre): 28-33. https://doi.org/10.1016/s0213-005x(08)76561-3.

Descours, Benjamin, Gaël Petitjean, José-Luis López-Zaragoza, Timothée Bruel, Raoul Raffel, Christina Psomas, Jacques Reynes, et al. 2017. « CD32a Is a Marker of a CD4 T-Cell HIV Reservoir Harbouring Replication-Competent Proviruses ». *Nature* 543 (7646): 564-67. https://doi.org/10.1038/nature21710.

Ebina, Hirotaka, Naoko Misawa, Yuka Kanemura, et Yoshio Koyanagi. 2013. «Harnessing the CRISPR/Cas9 System to Disrupt Latent HIV-1 Provirus ». *Scientific Reports* 3: 2510. https://doi.org/10.1038/srep02510.

Embretson, J., M. Zupancic, J. L. Ribas, A. Burke, P. Racz, K. Tenner-Racz, et A. T. Haase. 1993. « Massive Covert Infection of Helper T Lymphocytes and Macrophages by HIV during the Incubation Period of AIDS ». *Nature* 362 (6418): 359-62. https://doi.org/10.1038/362359a0.

Ettorre, Gabriella d', Mirko Paiardini, Giancarlo Ceccarelli, Guido Silvestri, et Vincenzo Vullo. 2011. «HIV-Associated Immune Activation: From Bench to Bedside ». *AIDS Research and Human Retroviruses* 27 (4): 355- 64. https://doi.org/10.1089/aid.2010.0342.

Evans, Vanessa A., Renée M. van der Sluis, Ajantha Solomon, Ashanti Dantanarayana, Catriona McNeil, Roger Garsia, Sarah Palmer, et al. 2018. «Programmed Cell Death-1 Contributes to the Establishment and Maintenance of HIV-1 Latency ». *AIDS (London, England)* 32 (11): 1491- 97. https://doi.org/10.1097/QAD.00000000001849.

Evering, Teresa H., Edwin Kamau, Leslie St Bernard, Charles B. Farmer, Xiang-Peng Kong, et Martin Markowitz. 2014. « Single Genome Analysis Reveals Genetic Characteristics of Neuroadaptation across HIV-1 Envelope ». *Retrovirology* 11 (août): 65. https://doi.org/10.1186/s12977-014-0065-0.

Faissner, Simon, Björn Ambrosius, Kirsten Schanzmann, Bastian Grewe, Anja Potthoff, JanMünch, Ulrich Sure, et al. 2014. «Cytoplasmic HIV-RNA in Monocytes DeterminesMicroglial Activation and Neuronal Cell Death in HIV-Associated Neurodegeneration ».ExperimentalNeurology261(novembre):685-97.https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2014.08.011.

Falcinelli, Shane D., Bonnie E. Shook-Sa, Morgan G. Dewey, Sumati Sridhar, Jenna Read, Jennifer Kirchherr, Katherine S. James, et al. 2020. « Impact of Biological Sex on Immune Activation and Frequency of the Latent HIV Reservoir During Suppressive Antiretroviral Therapy ». *The Journal of Infectious Diseases* 222 (11): 1843-52. https://doi.org/10.1093/infdis/jiaa298.

Farber, Donna L., Naomi A. Yudanin, et Nicholas P. Restifo. 2014. «Human Memory T Cells: Generation, Compartmentalization and Homeostasis ». *Nature Reviews. Immunology* 14 (1): 24- 35. https://doi.org/10.1038/nri3567.

Fenwick, Craig, Victor Joo, Patricia Jacquier, Alessandra Noto, Riddhima Banga, Matthieu Perreau, et Giuseppe Pantaleo. 2019. « T-Cell Exhaustion in HIV Infection ». *Immunological Reviews* 292 (1): 149-63. https://doi.org/10.1111/imr.12823.

Février, Michèle, Karim Dorgham, et Angelita Rebollo. 2011. «CD4+ T Cell Depletion in Human Immunodeficiency Virus (HIV) Infection: Role of Apoptosis ». *Viruses* 3 (5): 586- 612. https://doi.org/10.3390/v3050586.

Fiebig, Eberhard W., David J. Wright, Bhupat D. Rawal, Patricia E. Garrett, Richard T. Schumacher, Lorraine Peddada, Charles Heldebrant, et al. 2003. « Dynamics of HIV Viremia and Antibody Seroconversion in Plasma Donors: Implications for Diagnosis and Staging of

Primary HIV Infection. » *AIDS (London, England)* 17 (13): 1871-79. https://doi.org/10.1097/01.aids.0000076308.76477.b8.

Fletcher, Courtney V., Kathryn Staskus, Stephen W. Wietgrefe, Meghan Rothenberger, Cavan Reilly, Jeffrey G. Chipman, Greg J. Beilman, et al. 2014. « Persistent HIV-1 Replication Is Associated with Lower Antiretroviral Drug Concentrations in Lymphatic Tissues ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111 (6): 2307-12. https://doi.org/10.1073/pnas.1318249111.

Fourati, Slim, Sidonie Lambert-Niclot, Cathia Soulie, Isabelle Malet, Marc Antoine Valantin, Benjamin Descours, Zaina Ait-Arkoub, et al. 2012. «HIV-1 Genome Is Often Defective in PBMCs and Rectal Tissues after Long-Term HAART as a Result of APOBEC3 Editing and Correlates with the Size of Reservoirs ». *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 67 (10): 2323-26. https://doi.org/10.1093/jac/dks219.

Fourati, Slim, Isabelle Malet, Sidonie Lambert, Cathia Soulie, Marc Wirden, Philippe Flandre, Djeneba B. Fofana, et al. 2012. «E138K and M184I Mutations in HIV-1 Reverse Transcriptase Coemerge as a Result of APOBEC3 Editing in the Absence of Drug Exposure ». *AIDS (London, England)* 26 (13): 1619-24. https://doi.org/10.1097/QAD.0b013e3283560703.

Frank, Ines, Arpan Acharya, Nanda K. Routhu, Meropi Aravantinou, Justin L. Harper, Stephanie Maldonado, Maria Sole Cigoli, et al. 2019. « A Tat/Rev Induced Limiting Dilution Assay to Measure Viral Reservoirs in Non-Human Primate Models of HIV Infection ». *Scientific Reports* 9 (1): 12078. https://doi.org/10.1038/s41598-019-48354-3.

Freed, E. O., G. Englund, et M. A. Martin. 1995. «Role of the Basic Domain of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Matrix in Macrophage Infection ». *Journal of Virology* 69 (6): 3949- 54. https://doi.org/10.1128/JVI.69.6.3949-3954.1995.

Fromentin, Rémi, Wendy Bakeman, Mariam B. Lawani, Gabriela Khoury, Wendy Hartogensis, Sandrina DaFonseca, Marisela Killian, et al. 2016. « CD4+ T Cells Expressing

PD-1, TIGIT and LAG-3 Contribute to HIV Persistence during ART ». *PLoS Pathogens* 12 (7): e1005761. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005761.

Fromentin, Rémi, Sandrina DaFonseca, Cecilia T. Costiniuk, Mohamed El-Far, Francesco Andrea Procopio, Frederick M. Hecht, Rebecca Hoh, et al. 2019. « PD-1 Blockade Potentiates HIV Latency Reversal Ex Vivo in CD4+ T Cells from ART-Suppressed Individuals ». *Nature Communications* 10 (1): 814. https://doi.org/10.1038/s41467-019-08798-7.

Fun, Axel, Hoi Ping Mok, Mark R. Wills, et Andrew M. Lever. 2017. «A Highly Reproducible Quantitative Viral Outgrowth Assay for the Measurement of the Replication-Competent Latent HIV-1 Reservoir ». *Scientific Reports* 7 (février): 43231. https://doi.org/10.1038/srep43231.

Gall, Astrid, Steve Kaye, Stéphane Hué, David Bonsall, Richard Rance, Gregory J. Baillie, Sarah J. Fidler, et al. 2013. «Restriction of V3 Region Sequence Divergence in the HIV-1 Envelope Gene during Antiretroviral Treatment in a Cohort of Recent Seroconverters ». *Retrovirology* 10 (janvier): 8. https://doi.org/10.1186/1742-4690-10-8.

Ganusov, Vitaly V., et Rob J. De Boer. 2007. « Do Most Lymphocytes in Humans Really Reside in the Gut? » *Trends in Immunology* 28 (12): 514-18. https://doi.org/10.1016/j.it.2007.08.009.

García, Felipe, Núria Climent, Lambert Assoumou, Cristina Gil, Nuria González, José Alcamí, Agathe León, et al. 2011. « A Therapeutic Dendritic Cell-Based Vaccine for HIV-1 Infection ». *The Journal of Infectious Diseases* 203 (4): 473-78. https://doi.org/10.1093/infdis/jiq077.

García, Marcial, María Angeles Navarrete-Muñoz, José M. Ligos, Alfonso Cabello, Clara Restrepo, Juan Carlos López-Bernaldo, Francisco Javier de la Hera, et al. 2018. «CD32 Expression Is Not Associated to HIV-DNA Content in CD4 Cell Subsets of Individuals with Different Levels of HIV Control ». *Scientific Reports* 8 (1): 15541. https://doi.org/10.1038/s41598-018-33749-5.

Garraffo, Rodolphe. 2008. «Pharmacologie des inhibiteurs non nucléosidiques de la transcriptase inverse du VIH ». *Virologie* 12 (32): 15-28. https://doi.org/10.1684/vir.2008.0179.

Garrigue, I., I. Pellegrin, B. Hoen, B. Dumon, M. Harzic, M. H. Schrive, D. Séréni, et H. Fleury. 2000. « Cell-Associated HIV-1-DNA Quantitation after Highly Active Antiretroviral Therapy-Treated Primary Infection in Patients with Persistently Undetectable Plasma HIV-1 RNA ». *AIDS (London, England)* 14 (18): 2851-55. https://doi.org/10.1097/00002030-200012220-00006.

Ghosn, Jade, Christiane Deveau, Marie-Laure Chaix, Cécile Goujard, Julie Galimand, Yasmine Zitoun, Thierry Allègre, et al. 2010. «Despite Being Highly Diverse, Immunovirological Status Strongly Correlates with Clinical Symptoms during Primary HIV-1 Infection: A Cross-Sectional Study Based on 674 Patients Enrolled in the ANRS CO 06 PRIMO Cohort ». *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 65 (4): 741-48. https://doi.org/10.1093/jac/dkq035.

Gianella, Sara, Viktor von Wyl, Marek Fischer, Barbara Niederoest, Manuel Battegay, Enos Bernasconi, Matthias Cavassini, et al. 2011. « Effect of Early Antiretroviral Therapy during Primary HIV-1 Infection on Cell-Associated HIV-1 DNA and Plasma HIV-1 RNA ». *Antiviral Therapy* 16 (4): 535-45. https://doi.org/10.3851/IMP1776.

Giatsou, Eleni, Basma Abdi, Isabelle Plu, Nathalie Desire, Romain Palich, Vincent Calvez, Danielle Seilhean, Anne-Geneviève Marcelin, et Aude Jary. 2020. « Ultradeep Sequencing Compartmentalization Reveals HIV-1 Diversity and Resistance during HIV-1609 - 14. Encephalopathy ». AIDS (London, *England*) 34 (11): https://doi.org/10.1097/QAD.00000000002616.

Gillick, Kieran, Darja Pollpeter, Prabhjeet Phalora, Eun-Young Kim, Steven M. Wolinsky, et Michael H. Malim. 2013. «Suppression of HIV-1 Infection by APOBEC3 Proteins in Primary Human CD4(+) T Cells Is Associated with Inhibition of Processive Reverse

Transcription as Well as Excessive Cytidine Deamination ». *Journal of Virology* 87 (3): 1508-17. https://doi.org/10.1128/JVI.02587-12.

Global Health Policy. 2020. « https://www.kff.org/global-health-policy/fact-sheet/the-globalhivaids-epidemic/ », 1 juillet 2020.

Goila-Gaur, Ritu, et Klaus Strebel. 2008. «HIV-1 Vif, APOBEC, and Intrinsic Immunity ». *Retrovirology* 5 (juin): 51. https://doi.org/10.1186/1742-4690-5-51.

Gottlieb, M. S., R. Schroff, H. M. Schanker, J. D. Weisman, P. T. Fan, R. A. Wolf, et A. Saxon. 1981. «Pneumocystis Carinii Pneumonia and Mucosal Candidiasis in Previously Healthy Homosexual Men: Evidence of a New Acquired Cellular Immunodeficiency ». *The New England Journal of Medicine* 305 (24): 1425-31. https://doi.org/10.1056/NEJM198112103052401.

Goujard, Cécile, Mojgan Bonarek, Laurence Meyer, Fabrice Bonnet, Marie-Laure Chaix, Christiane Deveau, Martine Sinet, et al. 2006. « CD4 Cell Count and HIV DNA Level Are Independent Predictors of Disease Progression after Primary HIV Type 1 Infection in Untreated Patients ». *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America* 42 (5): 709- 15. https://doi.org/10.1086/500213.

Greenberg, Michael L., et Nick Cammack. 2004. «Resistance to Enfuvirtide, the First HIV Fusion Inhibitor ». *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 54 (2): 333-40. https://doi.org/10.1093/jac/dkh330.

Gulzar, Naveed, et Karen F. T. Copeland. 2004. « CD8+ T-Cells: Function and Response toHIVInfection ».CurrentHIVResearch2(1):23- 37.https://doi.org/10.2174/1570162043485077.

Guo, Fei, Shan Cen, Meijuan Niu, Yiliang Yang, Robert J. Gorelick, et Lawrence Kleiman. 2007. «The Interaction of APOBEC3G with Human Immunodeficiency Virus Type 1 Nucleocapsid Inhibits TRNA3Lys Annealing to Viral RNA ». *Journal of Virology* 81 (20): 11322-31. https://doi.org/10.1128/JVI.00162-07.
Gupta, Phalguni, Kelly B. Collins, Deena Ratner, Simon Watkins, Gregory J. Naus, Daniel V. Landers, et Bruce K. Patterson. 2002. « Memory CD4(+) T Cells Are the Earliest Detectable Human Immunodeficiency Virus Type 1 (HIV-1)-Infected Cells in the Female Genital Mucosal Tissue during HIV-1 Transmission in an Organ Culture System ». *Journal of Virology* 76 (19): 9868- 76. https://doi.org/10.1128/jvi.76.19.9868-9876.2002.

Gupta, Ravindra K., Sultan Abdul-Jawad, Laura E. McCoy, Hoi Ping Mok, Dimitra Peppa, Maria Salgado, Javier Martinez-Picado, et al. 2019. «HIV-1 Remission Following CCR5 Δ 32/ Δ 32 Haematopoietic Stem-Cell Transplantation ». *Nature* 568 (7751): 244-48. https://doi.org/10.1038/s41586-019-1027-4.

Gupta, Ravindra Kumar, Dimitra Peppa, Alison L. Hill, Cristina Gálvez, Maria Salgado, Matthew Pace, Laura E. McCoy, et al. 2020. « Evidence for HIV-1 Cure after CCR5 Δ 32/ Δ 32 Allogeneic Haemopoietic Stem-Cell Transplantation 30 Months Post Analytical Treatment Interruption: A Case Report ». *The Lancet HIV* 7 (5): e340-47. https://doi.org/10.1016/S2352-3018(20)30069-2.

Hale, Malika, Taylor Mesojednik, Guillermo S. Romano Ibarra, Jaya Sahni, Alison Bernard, Karen Sommer, Andrew M. Scharenberg, David J. Rawlings, et Thor A. Wagner. 2017. « Engineering HIV-Resistant, Anti-HIV Chimeric Antigen Receptor T Cells ». *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy* 25 (3): 570-79. https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2016.12.023.

Hamlyn, Elizabeth, Fiona M. Ewings, Kholoud Porter, David A. Cooper, Giuseppe Tambussi, Mauro Schechter, Court Pedersen, et al. 2012. « Plasma HIV Viral Rebound Following Protocol-Indicated Cessation of ART Commenced in Primary and Chronic HIV Infection ». *PloS One* 7 (8): e43754. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0043754.

Hamlyn, Elizabeth, Vicky Jones, Kholoud Porter, et Sarah Fidler. 2010. «Antiretroviral Treatment of Primary HIV Infection to Reduce Onward Transmission ». *Current Opinion in HIV and AIDS* 5 (4): 283- 90. https://doi.org/10.1097/COH.0b013e32833a6b11.

Harris, Reuben S., et Jaquelin P. Dudley. 2015. «APOBECs and Virus Restriction ». *Virology* 479- 480 (mai): 131- 45. https://doi.org/10.1016/j.virol.2015.03.012.

Harris, Reuben S., et Mark T. Liddament. 2004. «Retroviral Restriction by APOBEC Proteins ». *Nature Reviews Immunology* 4 (11): 868-77. https://doi.org/10.1038/nri1489.

Henrard, D. R., E. Daar, H. Farzadegan, S. J. Clark, J. Phillips, G. M. Shaw, et M. P. Busch. 1995. «Virologic and Immunologic Characterization of Symptomatic and Asymptomatic Primary HIV-1 Infection ». *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes and Human Retrovirology: Official Publication of the International Retrovirology Association* 9 (3): 305-10.

Hiener, Bonnie, Bethany A. Horsburgh, John-Sebastian Eden, Kirston Barton, Timothy E. Schlub, Eunok Lee, Susanne von Stockenstrom, et al. 2017. « Identification of Genetically Intact HIV-1 Proviruses in Specific CD4+ T Cells from Effectively Treated Participants ». *Cell Reports* 21 (3): 813- 22. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.09.081.

Ho, Ya-Chi, Liang Shan, Nina N. Hosmane, Jeffrey Wang, Sarah B. Laskey, Daniel I. S. Rosenbloom, Jun Lai, Joel N. Blankson, Janet D. Siliciano, et Robert F. Siliciano. 2013. « Replication-Competent Noninduced Proviruses in the Latent Reservoir Increase Barrier to HIV-1 Cure ». *Cell* 155 (3): 540- 51. https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.09.020.

Hoang, Timothy N., et Mirko Paiardini. 2019. «Role of cytokine agonists and immune checkpoint inhibitors towards HIV remission ». *Current opinion in HIV and AIDS* 14 (2): 121-28. https://doi.org/10.1097/COH.0000000000528.

Hocqueloux, Laurent, Véronique Avettand-Fènoël, Sophie Jacquot, Thierry Prazuck, Eric Legac, Adeline Mélard, Mohamadou Niang, et al. 2013. « Long-Term Antiretroviral Therapy Initiated during Primary HIV-1 Infection Is Key to Achieving Both Low HIV Reservoirs and Normal T Cell Counts ». *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 68 (5): 1169-78. https://doi.org/10.1093/jac/dks533.

Hoen, Bruno, David A. Cooper, Fiona C. Lampe, Luc Perrin, Nathan Clumeck, Andrew N. Phillips, Li-Ean Goh, et al. 2007. « Predictors of Virological Outcome and Safety in Primary HIV Type 1-Infected Patients Initiating Quadruple Antiretroviral Therapy: QUEST GW PROB3005 ». *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America* 45 (3): 381- 90. https://doi.org/10.1086/519428.

Holmes, Rebecca K., Fransje A. Koning, Kate N. Bishop, et Michael H. Malim. 2007. « APOBEC3F Can Inhibit the Accumulation of HIV-1 Reverse Transcription Products in the Absence of Hypermutation. Comparisons with APOBEC3G ». *The Journal of Biological Chemistry* 282 (4): 2587-95. https://doi.org/10.1074/jbc.M607298200.

Hong, Feiyu, Evgenia Aga, Anthony R. Cillo, Aarika L. Yates, Guillaume Besson, Elizabeth Fyne, Dianna L. Koontz, Cheryl Jennings, Lu Zheng, et John W. Mellors. 2016. «Novel Assays for Measurement of Total Cell-Associated HIV-1 DNA and RNA ». *Journal of Clinical Microbiology* 54 (4): 902-11. https://doi.org/10.1128/JCM.02904-15.

Hu, Wei-Shau, et Stephen H. Hughes. 2012. «HIV-1 Reverse Transcription ». *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 2 (10). https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006882.

Hurst, Jacob, Matthias Hoffmann, Matthew Pace, James P. Williams, John Thornhill, Elizabeth Hamlyn, Jodi Meyerowitz, et al. 2015. « Immunological Biomarkers Predict HIV-1 Viral Rebound after Treatment Interruption ». *Nature Communications* 6 (octobre): 8495. https://doi.org/10.1038/ncomms9495.

Hütter, Gero, Daniel Nowak, Maximilian Mossner, Susanne Ganepola, Arne Müssig, Kristina Allers, Thomas Schneider, et al. 2009. «Long-Term Control of HIV by CCR5 Delta32/Delta32 Stem-Cell Transplantation ». *The New England Journal of Medicine* 360 (7): 692-98. https://doi.org/10.1056/NEJMoa0802905.

Imamichi, Hiromi, Robin L. Dewar, Joseph W. Adelsberger, Catherine A. Rehm, Una O'Doherty, Ellen E. Paxinos, Anthony S. Fauci, et H. Clifford Lane. 2016. « Defective HIV-1 Proviruses Produce Novel Protein-Coding RNA Species in HIV-Infected Patients on

Combination Antiretroviral Therapy ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 113 (31): 8783- 88. https://doi.org/10.1073/pnas.1609057113.

Imamichi, Hiromi, Mindy Smith, Joseph W. Adelsberger, Taisuke Izumi, Francesca Scrimieri, Brad T. Sherman, Catherine A. Rehm, et al. 2020. « Defective HIV-1 Proviruses Produce Viral Proteins ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 117 (7): 3704- 10. https://doi.org/10.1073/pnas.1917876117.

Iwabu, Yukie, Masanobu Kinomoto, Masashi Tatsumi, Hideaki Fujita, Mari Shimura, Yoshitaka Tanaka, Yukihito Ishizaka, et al. 2010. « Differential Anti-APOBEC3G Activity of HIV-1 Vif Proteins Derived from Different Subtypes ». *The Journal of Biological Chemistry* 285 (46): 35350- 58. https://doi.org/10.1074/jbc.M110.173286.

Iwatani, Yasumasa, Denise S. B. Chan, F. Wang, Kristen Stewart-Maynard, Wataru Sugiura, Angela M. Gronenborn, Ioulia Rouzina, Mark C. Williams, Karin Musier-Forsyth, et Judith G. Levin. 2007. « Deaminase-Independent Inhibition of HIV-1 Reverse Transcription by APOBEC3G ». *Nucleic Acids Research* 35 (21): 7096-7108. https://doi.org/10.1093/nar/gkm750.

J, Mikulak, Oriolo F, Zaghi E, Di Vito C, et Mavilio D. 2017. « Natural Killer Cells in HIV-1 Infection and Therapy ». *AIDS (London, England)* 31 (17). https://doi.org/10.1097/QAD.0000000001645.

Jaafoura, S., M. G. de Goër de Herve, E. A. Hernandez-Vargas, H. Hendel-Chavez, M. Abdoh, M. C. Mateo, R. Krzysiek, et al. 2014. « Progressive Contraction of the Latent HIV Reservoir around a Core of Less-Differentiated CD4⁺ Memory T Cells ». *Nature Communications* 5 (novembre): 5407. https://doi.org/10.1038/ncomms6407.

Jäger, Stefanie, Dong Young Kim, Judd F. Hultquist, Keisuke Shindo, Rebecca S. LaRue, Eunju Kwon, Ming Li, et al. 2011. «Vif Hijacks CBF-β to Degrade APOBEC3G and Promote HIV-1 Infection ». *Nature* 481 (7381): 371-75. https://doi.org/10.1038/nature10693.

147

Jain, Vivek, Wendy Hartogensis, Peter Bacchetti, Peter W. Hunt, Hiroyu Hatano, Elizabeth Sinclair, Lorrie Epling, et al. 2013. « Antiretroviral Therapy Initiated within 6 Months of HIV Infection Is Associated with Lower T-Cell Activation and Smaller HIV Reservoir Size ». *The Journal of Infectious Diseases* 208 (8): 1202- 11. https://doi.org/10.1093/infdis/jit311.

Jambo, K. C., D. H. Banda, A. M. Kankwatira, N. Sukumar, T. J. Allain, R. S. Heyderman, D.
G. Russell, et H. C. Mwandumba. 2014. «Small Alveolar Macrophages Are Infected Preferentially by HIV and Exhibit Impaired Phagocytic Function ». *Mucosal Immunology* 7 (5): 1116-26. https://doi.org/10.1038/mi.2013.127.

Janini, M., M. Rogers, D. R. Birx, et F. E. McCutchan. 2001. « Human Immunodeficiency Virus Type 1 DNA Sequences Genetically Damaged by Hypermutation Are Often Abundant in Patient Peripheral Blood Mononuclear Cells and May Be Generated during Near-Simultaneous Infection and Activation of CD4(+) T Cells ». *Journal of Virology* 75 (17): 7973- 86. https://doi.org/10.1128/jvi.75.17.7973-7986.2001.

Jia, Xiaofei, Qi Zhao, et Yong Xiong. 2015. «HIV Suppression by Host Restriction Factors and Viral Immune Evasion ». *Current Opinion in Structural Biology* 31 (avril): 106-14. https://doi.org/10.1016/j.sbi.2015.04.004.

Jilg, Nikolaus, et Jonathan Z. Li. 2019. « One Patient Has Been Cured of HIV – Will There Ever Be More? » *Infectious disease clinics of North America* 33 (3): 857-68. https://doi.org/10.1016/j.idc.2019.04.007.

Johnson, Douglas B., Ryan J. Sullivan, et Alexander M. Menzies. 2017. «Immune Checkpoint Inhibitors in Challenging Populations ». *Cancer* 123 (11): 1904-11. https://doi.org/10.1002/cncr.30642.

Josefsson, Lina, Susanne von Stockenstrom, Nuno R. Faria, Elizabeth Sinclair, Peter Bacchetti, Maudi Killian, Lorrie Epling, et al. 2013. « The HIV-1 Reservoir in Eight Patients on Long-Term Suppressive Antiretroviral Therapy Is Stable with Few Genetic Changes over

Time ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110 (51): E4987-4996. https://doi.org/10.1073/pnas.1308313110.

Jóźwik, Ilona K., Dario O. Passos, et Dmitry Lyumkis. 2020. « Structural Biology of HIV Integrase Strand Transfer Inhibitors ». *Trends in Pharmacological Sciences* 41 (9): 611-26. https://doi.org/10.1016/j.tips.2020.06.003.

Kang, HyunJun, Petra Minder, Mi Ae Park, Walatta-Tseyon Mesquitta, Bruce E. Torbett, et Igor I. Slukvin. 2015. «CCR5 Disruption in Induced Pluripotent Stem Cells Using CRISPR/Cas9 Provides Selective Resistance of Immune Cells to CCR5-Tropic HIV-1 Virus ». *Molecular Therapy. Nucleic Acids* 4 (décembre): e268. https://doi.org/10.1038/mtna.2015.42.

Karlsson, A. C., M. Birk, S. Lindbäck, H. Gaines, J. E. Mittler, et A. Sönnerborg. 2001. « Initiation of Therapy during Primary HIV Type 1 Infection Results in a Continuous Decay of Proviral DNA and a Highly Restricted Viral Evolution ». *AIDS Research and Human Retroviruses* 17 (5): 409- 16. https://doi.org/10.1089/088922201750102463.

Kaufmann, Daniel E., Paul M. Bailey, John Sidney, Bradford Wagner, Philip J. Norris, Mary N. Johnston, Lisa A. Cosimi, et al. 2004. «Comprehensive Analysis of Human Immunodeficiency Virus Type 1-Specific CD4 Responses Reveals Marked Immunodominance of gag and nef and the Presence of Broadly Recognized Peptides ». *Journal of Virology* 78 (9): 4463-77. https://doi.org/10.1128/JVI.78.9.4463-4477.2004.

Kaufmann, Daniel E., Daniel G. Kavanagh, Florencia Pereyra, John J. Zaunders, Elizabeth W. Mackey, Toshiyuki Miura, Sarah Palmer, et al. 2007. « Upregulation of CTLA-4 by HIV-Specific CD4+ T Cells Correlates with Disease Progression and Defines a Reversible Immune Dysfunction ». *Nature Immunology* 8 (11): 1246- 54. https://doi.org/10.1038/ni1515.

Kaufmann, Daniel E., Mathias Lichterfeld, Marcus Altfeld, Marylyn M. Addo, Mary N. Johnston, Paul K. Lee, Bradford S. Wagner, et al. 2004. « Limited Durability of Viral Control

Following Treated Acute HIV Infection ». *PLoS Medicine* 1 (2): e36. https://doi.org/10.1371/journal.pmed.0010036.

Kearney, M., F. Maldarelli, W. Shao, J. B. Margolick, E. S. Daar, J. W. Mellors, V. Rao, J. M. Coffin, et S. Palmer. 2009. « Human Immunodeficiency Virus Type 1 Population Genetics and Adaptation in Newly Infected Individuals ». *Journal of Virology* 83 (6): 2715-27. https://doi.org/10.1128/JVI.01960-08.

Kearney, Mary F., Jonathan Spindler, Wei Shao, Sloane Yu, Elizabeth M. Anderson, Angeline O'Shea, Catherine Rehm, et al. 2014. «Lack of Detectable HIV-1 Molecular Evolution during Suppressive Antiretroviral Therapy ». *PLoS Pathogens* 10 (3): e1004010. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004010.

Kearney, Mary F., Ann Wiegand, Wei Shao, William R. McManus, Michael J. Bale, Brian Luke, Frank Maldarelli, John W. Mellors, et John M. Coffin. 2017. «Ongoing HIV Replication During ART Reconsidered ». *Open Forum Infectious Diseases* 4 (3): ofx173. https://doi.org/10.1093/ofid/ofx173.

Keele, Brandon F., Elena E. Giorgi, Jesus F. Salazar-Gonzalez, Julie M. Decker, Kimmy T. Pham, Maria G. Salazar, Chuanxi Sun, et al. 2008. « Identification and Characterization of Transmitted and Early Founder Virus Envelopes in Primary HIV-1 Infection ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (21): 7552-57. https://doi.org/10.1073/pnas.0802203105.

Khan, Shahzada, Sushama Telwatte, Martin Trapecar, Steven Yukl, et Shomyseh Sanjabi. 2017. «Differentiating Immune Cell Targets in Gut-Associated Lymphoid Tissue for HIV Cure ». *AIDS Research and Human Retroviruses* 33 (Suppl 1): S-40-S-58. https://doi.org/10.1089/aid.2017.0153.

Kim, Eun-Young, Ramon Lorenzo-Redondo, Susan J. Little, Yoon-Seok Chung, Prabhjeet K. Phalora, Irina Maljkovic Berry, John Archer, et al. 2014. «Human APOBEC3 Induced Mutation of Human Immunodeficiency Virus Type-1 Contributes to Adaptation and Evolution in Natural Infection ». *PLoS Pathogens* 10 (7): e1004281. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004281.

Kim, Youry, Jenny L. Anderson, et Sharon R. Lewin. 2018. «Getting the "Kill" into "Shock and Kill": Strategies to Eliminate Latent HIV ». *Cell Host & Microbe* 23 (1): 14-26. https://doi.org/10.1016/j.chom.2017.12.004.

Kiselinova, Maja, Alexander O. Pasternak, Ward De Spiegelaere, Dirk Vogelaers, Ben Berkhout, et Linos Vandekerckhove. 2014. « Comparison of Droplet Digital PCR and Seminested Real-Time PCR for Quantification of Cell-Associated HIV-1 RNA ». *PloS One* 9 (1): e85999. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0085999.

Kline, Christopher, Jean Ndjomou, Tamera Franks, Rebecca Kiser, Vicky Coalter, Jeremy Smedley, Michael Piatak, John W. Mellors, Jeffrey D. Lifson, et Zandrea Ambrose. 2013. « Persistence of Viral Reservoirs in Multiple Tissues after Antiretroviral Therapy Suppression in a Macaque RT-SHIV Model ». *PloS One* 8 (12): e84275. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0084275.

Koelsch, Kersten K., Christoph Boesecke, Kristin McBride, Linda Gelgor, Paul Fahey, VenNatarajan, David Baker, et al. 2011. « Impact of Treatment with Raltegravir during Primaryor Chronic HIV Infection on RNA Decay Characteristics and the HIV Viral Reservoir ».AIDS(London, England)25(17):2069-78.https://doi.org/10.1097/QAD.0b013e32834b9658.

Koppensteiner, Herwig, Ruth Brack-Werner, et Michael Schindler. 2012. « Macrophages and Their Relevance in Human Immunodeficiency Virus Type I Infection ». *Retrovirology* 9 (octobre): 82. https://doi.org/10.1186/1742-4690-9-82.

Korber, B., C. Kuiken, B. Foley, B. Hahn, F. McCutchan, J. Mellors, et J. Sodroski. 1998. « Human retroviruses and AIDS ». *Los Alamos National Laboratory, Los Alamos, NM*.

Kourteva, Yordanka, MariaPia De Pasquale, Tara Allos, Chara McMunn, et Richard T. D'Aquila. 2012. « APOBEC3G Expression and Hypermutation Are Inversely Associated with 151

Human Immunodeficiency Virus Type 1 (HIV-1) Burden in Vivo ». *Virology* 430 (1): 1-9. https://doi.org/10.1016/j.virol.2012.03.018.

Kozal, Michael, Judith Aberg, Gilles Pialoux, Pedro Cahn, Melanie Thompson, Jean-Michel Molina, Beatriz Grinsztejn, et al. 2020. «Fostemsavir in Adults with Multidrug-Resistant HIV-1 Infection ». *New England Journal of Medicine* 382 (13): 1232-43. https://doi.org/10.1056/NEJMoa1902493.

Kuhlmann, Anne-Sophie, Christopher W. Peterson, et Hans-Peter Kiem. 2018. «Chimeric Antigen Receptor T-Cell Approaches to HIV Cure ». *Current Opinion in HIV and AIDS* 13 (5): 446-53. https://doi.org/10.1097/COH.00000000000485.

Kulpa, Deanna A., et Nicolas Chomont. 2015. «HIV Persistence in the Setting of Antiretroviral Therapy: When, Where and How Does HIV Hide? » *Journal of Virus Eradication* 1 (2): 59-66.

Kuzmichev, Yury V., Rebecca T. Veenhuis, Christopher W. Pohlmeyer, Caroline C. Garliss, Victoria Ek Walker-Sperling, et Joel N. Blankson. 2017. « A CD3/CD28 Microbead-Based HIV-1 Viral Outgrowth Assay ». *Journal of Virus Eradication* 3 (2): 85-89.

Laanani, Moussa, Jade Ghosn, Asma Essat, Adeline Melard, Rémonie Seng, Marine Gousset, Henri Panjo, et al. 2015. « Impact of the Timing of Initiation of Antiretroviral Therapy During Primary HIV-1 Infection on the Decay of Cell-Associated HIV-DNA ». *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America* 60 (11): 1715- 21. https://doi.org/10.1093/cid/civ171.

Lada, Steven M., Karissa Huang, D. Jake VanBelzen, Luis J. Montaner, Una O'Doherty, et Douglas D. Richman. 2018. « Quantitation of Integrated HIV Provirus by Pulsed-Field Gel Electrophoresis and Droplet Digital PCR ». *Journal of Clinical Microbiology* 56 (12). https://doi.org/10.1128/JCM.01158-18.

Lafeuillade, Alain, Antoine Cheret, Gilles Hittinger, David Bernardini, Caroline Cuquemelle, Eric Jullian, et Cécile Poggi. 2009. «Rectal Cell-Associated HIV-1 RNA: A New Marker 152 Ready for the Clinic ». *HIV Clinical Trials* 10 (5): 324- 27. https://doi.org/10.1310/hct1005-324.

Laird, Gregory M., Evelyn E. Eisele, S. Alireza Rabi, Jun Lai, Stanley Chioma, Joel N. Blankson, Janet D. Siliciano, et Robert F. Siliciano. 2013. «Rapid Quantification of the Latent Reservoir for HIV-1 Using a Viral Outgrowth Assay ». *PLoS Pathogens* 9 (5): e1003398. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003398.

Laird, Gregory M., Daniel I. S. Rosenbloom, Jun Lai, Robert F. Siliciano, et Janet D. Siliciano. 2016. « Measuring the Frequency of Latent HIV-1 in Resting CD4+ T Cells Using a Limiting Dilution Coculture Assay ». In *HIV Protocols*, édité par Vinayaka R. Prasad et Ganjam V. Kalpana, 239- 53. Methods in Molecular Biology. New York, NY: Springer. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3046-3_16.

Lambert-Niclot, Sidonie, Roland Tubiana, Céline Beaudoux, Gilles Lefebvre, Fabienne Caby, Manuela Bonmarchand, Michèle Naouri, et al. 2012. « Detection of HIV-1 RNA in Seminal Plasma Samples from Treated Patients with Undetectable HIV-1 RNA in Blood Plasma on a 2002-2011 Survey ». *AIDS (London, England)* 26 (8): 971-75. https://doi.org/10.1097/QAD.0b013e328352ae09.

Lambotte, Olivier, Faroudy Boufassa, Yoann Madec, Ahn Nguyen, Cécile Goujard, Laurence Meyer, Christine Rouzioux, Alain Venet, Jean-François Delfraissy, et SEROCO-HEMOCO Study Group. 2005. « HIV Controllers: A Homogeneous Group of HIV-1—Infected Patients with Spontaneous Control of Viral Replication ». *Clinical Infectious Diseases* 41 (7): 1053- 56. https://doi.org/10.1086/433188.

Lau, Jillian S. Y., Miranda Z. Smith, Sharon R. Lewin, et James H. McMahon. 2019. « Clinical Trials of Antiretroviral Treatment Interruption in HIV-Infected Individuals ». *AIDS* (*London, England*) 33 (5): 773-91. https://doi.org/10.1097/QAD.00000000002113. Lederman, Michael M., et Earl Pike. 2017. « Ten Years HIV Free: An Interview with "The Berlin Patient," Timothy Ray Brown ». *Pathogens & Immunity* 2 (3): 422-30. https://doi.org/10.20411/pai.v2i3.226.

Lee, Guinevere Q., Nina Orlova-Fink, Kevin Einkauf, Fatema Z. Chowdhury, Xiaoming Sun, Sean Harrington, Hsiao-Hsuan Kuo, et al. 2017. « Clonal Expansion of Genome-Intact HIV-1 in Functionally Polarized Th1 CD4+ T Cells ». *The Journal of Clinical Investigation* 127 (7): 2689- 96. https://doi.org/10.1172/JCI93289.

Lee, Guinevere Q., Kavidha Reddy, Kevin B. Einkauf, Kamini Gounder, Joshua M. Chevalier, Krista L. Dong, Bruce D. Walker, Xu G. Yu, Thumbi Ndung'u, et Mathias Lichterfeld. 2019. « HIV-1 DNA Sequence Diversity and Evolution during Acute Subtype C Infection ». *Nature Communications* 10 (1): 2737. https://doi.org/10.1038/s41467-019-10659-2.

Lei, Jie, Xiaowan Yin, Hong Shang, et Yongjun Jiang. 2019. «IP-10 Is Highly Involved in HIV Infection ». *Cytokine* 115 (mars): 97-103. https://doi.org/10.1016/j.cyto.2018.11.018.

Lepore, Luciana, Claudia Fabrizio, Davide Fiore Bavaro, Eugenio Milano, Anna Volpe, Antonella Lagioia, Gioacchino Angarano, Annalisa Saracino, et Laura Monno. 2020. « Gp120 Substitutions at Positions Associated with Resistance to Fostemsavir in Treatment-Naive HIV-1-Positive Individuals ». *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 75 (6): 1580-87. https://doi.org/10.1093/jac/dkaa034.

Li, Xiao-Yu, Fei Guo, Li Zhang, Lawrence Kleiman, et Shan Cen. 2007. «APOBEC3G Inhibits DNA Strand Transfer during HIV-1 Reverse Transcription ». *The Journal of Biological Chemistry* 282 (44): 32065-74. https://doi.org/10.1074/jbc.M703423200.

Lillo, F., M. Grasso, S. Lodini, B. Capiluppi, A. Lazzarin, et G. Tambussi. 2002. «HIV-1 DNA and RNA Kinetics in Primary HIV Infection ». *Journal of Biological Regulators and Homeostatic Agents* 16 (1): 49- 52.

Lisovsky, Irene, Susan M. Schader, Richard D. Sloan, Maureen Oliveira, Dimitrios Coutsinos, Nicole F. Bernard, et Mark A. Wainberg. 2013. «HIV-1 Subtype Variability in Vif Derived from Molecular Clones Affects APOBEC3G-Mediated Host Restriction ». *Intervirology* 56 (4): 258- 64. https://doi.org/10.1159/000348513.

Lopalco, Lucia. 2010. « CCR5: From Natural Resistance to a New Anti-HIV Strategy ». *Viruses* 2 (2): 574- 600. https://doi.org/10.3390/v2020574.

Lorenzo-Redondo, Ramon, Helen R. Fryer, Trevor Bedford, Eun-Young Kim, John Archer, Sergei L. Kosakovsky Pond, Yoon-Seok Chung, et al. 2016. « Persistent HIV-1 Replication Maintains the Tissue Reservoir during Therapy ». *Nature* 530 (7588): 51-56. https://doi.org/10.1038/nature16933.

LosAlamosNationalLaboratory.2018.« https://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/HIV/COMPENDIUM/2018compendium.html »,2018.

Lucas, Sebastian, et Ann Marie Nelson. 2015. «HIV and the Spectrum of Human Disease ». *The Journal of Pathology* 235 (2): 229- 41. https://doi.org/10.1002/path.4449.

Luo, Kun, Tao Wang, Bindong Liu, Chunjuan Tian, Zuoxiang Xiao, John Kappes, et Xiao-Fang Yu. 2007. «Cytidine Deaminases APOBEC3G and APOBEC3F Interact with Human Immunodeficiency Virus Type 1 Integrase and Inhibit Proviral DNA Formation ». *Journal of Virology* 81 (13): 7238- 48. https://doi.org/10.1128/JVI.02584-06.

Machado, Lucas de Almeida, et Ana Carolina Ramos Guimarães. 2020. « Evidence for Disruption of Mg2+ Pair as a Resistance Mechanism Against HIV-1 Integrase Strand Transfer Inhibitors ». *Frontiers in Molecular Biosciences* 7. https://doi.org/10.3389/fmolb.2020.00170.

Maina, Edward K., Asma A. Adan, Haddison Mureithi, Joseph Muriuki, et Raphael M. Lwembe. 2021. « A Review of Current Strategies Towards the Elimination of Latent HIV-1 and Subsequent HIV-1 Cure ». *Current HIV Research* 19 (1): 14-26. https://doi.org/10.2174/1570162X18999200819172009.

Malet, Isabelle, Frédéric Subra, Charlotte Charpentier, Gilles Collin, Diane Descamps, Vincent Calvez, Anne-Geneviève Marcelin, et Olivier Delelis. 2017. « Mutations Located Outside the Integrase Gene Can Confer Resistance to HIV-1 Integrase Strand Transfer Inhibitors ». *MBio* 8 (5). https://doi.org/10.1128/mBio.00922-17.

Marcelin, Anne-Geneviève, Roland Tubiana, Sidonie Lambert-Niclot, Gilles Lefebvre, Stéphanie Dominguez, Manuela Bonmarchand, Daniele Vauthier-Brouzes, et al. 2008. « Detection of HIV-1 RNA in Seminal Plasma Samples from Treated Patients with Undetectable HIV-1 RNA in Blood Plasma ». *AIDS (London, England)* 22 (13): 1677-79. https://doi.org/10.1097/QAD.0b013e32830abdc8.

Marin, Mariana, Kristine M. Rose, Susan L. Kozak, et David Kabat. 2003. «HIV-1 Vif Protein Binds the Editing Enzyme APOBEC3G and Induces Its Degradation ». *Nature Medicine* 9 (11): 1398- 1403. https://doi.org/10.1038/nm946.

Martinez-Cajas, Jorge L., et Mark A. Wainberg. 2007. « Protease Inhibitor Resistance in HIV-Infected Patients: Molecular and Clinical Perspectives ». *Antiviral Research* 76 (3): 203-21. https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2007.06.010.

Massanella, Marta, et Douglas D. Richman. 2016. «Measuring the Latent Reservoir in Vivo». *The Journal of Clinical Investigation* 126 (2): 464-72. https://doi.org/10.1172/JCI80567.

Mbisa, Jean L., Rebekah Barr, James A. Thomas, Nick Vandegraaff, Irene J. Dorweiler, Evguenia S. Svarovskaia, William L. Brown, et al. 2007. « Human Immunodeficiency Virus Type 1 CDNAs Produced in the Presence of APOBEC3G Exhibit Defects in Plus-Strand DNA Transfer and Integration ». *Journal of Virology* 81 (13): 7099-7110. https://doi.org/10.1128/JVI.00272-07.

Mbisa, Jean L., Wei Bu, et Vinay K. Pathak. 2010. « APOBEC3F and APOBEC3G Inhibit HIV-1 DNA Integration by Different Mechanisms ». *Journal of Virology* 84 (10): 5250- 59. https://doi.org/10.1128/JVI.02358-09. Mehle, Andrew, Bettina Strack, Petronela Ancuta, Chengsheng Zhang, Mark McPike, et Dana Gabuzda. 2004. « Vif Overcomes the Innate Antiviral Activity of APOBEC3G by Promoting Its Degradation in the Ubiquitin-Proteasome Pathway ». *The Journal of Biological Chemistry* 279 (9): 7792- 98. https://doi.org/10.1074/jbc.M313093200.

Meier, Angela, Aranya Bagchi, Harlyn K. Sidhu, Galit Alter, Todd J. Suscovich, Daniel G. Kavanagh, Hendrik Streeck, et al. 2008. «Upregulation of PD-L1 on Monocytes and Dendritic Cells by HIV-1 Derived TLR Ligands ». *AIDS (London, England)* 22 (5): 655-58. https://doi.org/10.1097/QAD.0b013e3282f4de23.

Mellors, J. W., C. R. Rinaldo, P. Gupta, R. M. White, J. A. Todd, et L. A. Kingsley. 1996. « Prognosis in HIV-1 Infection Predicted by the Quantity of Virus in Plasma ». *Science (New York, N.Y.)* 272 (5265): 1167-70. https://doi.org/10.1126/science.272.5265.1167.

Meltzer, Beatrix, Deemah Dabbagh, Jia Guo, Fatah Kashanchi, Mudit Tyagi, et Yuntao Wu. 2018. « Tat Controls Transcriptional Persistence of Unintegrated HIV Genome in Primary Human Macrophages ». *Virology* 518 (mai): 241-52. https://doi.org/10.1016/j.virol.2018.03.006.

Méndez, Catalina, Scott Ledger, Kathy Petoumenos, Chantelle Ahlenstiel, et Anthony D. Kelleher. 2018. «RNA-Induced Epigenetic Silencing Inhibits HIV-1 Reactivation from Latency ». *Retrovirology* 15 (1): 67. https://doi.org/10.1186/s12977-018-0451-0.

Merino, Kristen M., Carolina Allers, Elizabeth S. Didier, et Marcelo J. Kuroda. 2017. « Role of Monocyte/Macrophages during HIV/SIV Infection in Adult and Pediatric Acquired Immune Deficiency Syndrome ». *Frontiers in Immunology* 8: 1693. https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01693.

Metcalf Pate, Kelly A., et Joel N. Blankson. 2017. «The Mouse Viral Outgrowth Assay: Avatars for the Detection of HIV-1 Reservoirs». *Retrovirology* 14 (1): 52. https://doi.org/10.1186/s12977-017-0376-z. Metcalf Pate, Kelly A., Christopher W. Pohlmeyer, Victoria E. Walker-Sperling, Jeremy B. Foote, Kevin M. Najarro, Catherine G. Cryer, Maria Salgado, et al. 2015. « A Murine Viral Outgrowth Assay to Detect Residual HIV Type 1 in Patients With Undetectable Viral Loads ». *The Journal of Infectious Diseases* 212 (9): 1387-96. https://doi.org/10.1093/infdis/jiv230.

Miller, Elizabeth, et Nina Bhardwaj. 2013. « Dendritic Cell Dysregulation during HIV-1 Infection ». *Immunological Reviews* 254 (1): 170- 89. https://doi.org/10.1111/imr.12082.

Miyakawa, Kei, Satoko Matsunaga, Kazuhiko Kanou, Atsushi Matsuzawa, Ryo Morishita, Ayumi Kudoh, Keisuke Shindo, et al. 2015. «ASK1 Restores the Antiviral Activity of APOBEC3G by Disrupting HIV-1 Vif-Mediated Counteraction ». *Nature Communications* 6 (avril): 6945. https://doi.org/10.1038/ncomms7945.

Moir, Susan, et Anthony S. Fauci. 2017. «B-Cell Responses to HIV Infection». *Immunological Reviews* 275 (1): 33-48. https://doi.org/10.1111/imr.12502.

Monteiro, Patricia, Annie Gosselin, Vanessa Sue Wacleche, Mohamed El-Far, Elias A. Said, Hassen Kared, Nathalie Grandvaux, Mohamed-Rachid Boulassel, Jean-Pierre Routy, et Petronela Ancuta. 2011. « Memory CCR6+CD4+ T Cells Are Preferential Targets for Productive HIV Type 1 Infection Regardless of Their Expression of Integrin B7 ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 186 (8): 4618- 30. https://doi.org/10.4049/jimmunol.1004151.

Moranguinho, Ines, et Susana T. Valente. 2020. « Block-And-Lock: New Horizons for a Cure for HIV-1 ». *Viruses* 12 (12). https://doi.org/10.3390/v12121443.

Morlat., Philippe. 2016. Prise en charge médicale des personnes vivant avec le VIH – Recommandations du groupe d'experts.Primo-Infection à VIH.

Mothe, Beatriz, et Christian Brander. 2018. «HIV T-Cell Vaccines». *Advances in Experimental Medicine and Biology* 1075: 31- 51. https://doi.org/10.1007/978-981-13-0484-2_2.

Muema, Daniel M., Ngomu A. Akilimali, Okechukwu C. Ndumnego, Sipho S. Rasehlo, Raveshni Durgiah, Doty B. A. Ojwach, Nasreen Ismail, et al. 2020. « Association between the Cytokine Storm, Immune Cell Dynamics, and Viral Replicative Capacity in Hyperacute HIV Infection ». *BMC Medicine* 18 (1): 81. https://doi.org/10.1186/s12916-020-01529-6.

Mulder, Lubbertus C. F., Ariana Harari, et Viviana Simon. 2008. «Cytidine Deamination Induced HIV-1 Drug Resistance ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (14): 5501- 6. https://doi.org/10.1073/pnas.0710190105.

Mylvaganam, Geetha H., Guido Silvestri, et Rama Rao Amara. 2015. «HIV Therapeutic Vaccines: Moving towards a Functional Cure ». *Current Opinion in Immunology* 35 (août): 1-8. https://doi.org/10.1016/j.coi.2015.05.001.

Newman, Edmund N. C., Rebecca K. Holmes, Heather M. Craig, Kevin C. Klein, Jaisri R. Lingappa, Michael H. Malim, et Ann M. Sheehy. 2005. « Antiviral Function of APOBEC3G Can Be Dissociated from Cytidine Deaminase Activity ». *Current Biology: CB* 15 (2): 166-70. https://doi.org/10.1016/j.cub.2004.12.068.

Nicholas, Katherine J., Emily K. Zern, Louise Barnett, Rita M. Smith, Shelly L. Lorey, Courtney A. Copeland, Shanmugalakshmi Sadagopal, et Spyros A. Kalams. 2013. « B Cell Responses to HIV Antigen Are a Potent Correlate of Viremia in HIV-1 Infection and Improve with PD-1 Blockade ». *PloS One* 8 (12): e84185. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0084185.

Noel, Nicolas, Nathalie Lerolle, Camille Lécuroux, Cécile Goujard, Alain Venet, Asier Saez-Cirion, Veronique Avettand-Fenoël, et al. 2015. « Immunologic and Virologic Progression in HIV Controllers: The Role of Viral "Blips" and Immune Activation in the ANRS CO21 CODEX Study ». *PloS One* 10 (7): e0131922. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0131922.

Nolan, David J., Rebecca Rose, Patricia H. Rodriguez, Marco Salemi, Elyse J. Singer, Susanna L. Lamers, et Michael S. McGrath. 2018. «The Spleen Is an HIV-1 Sanctuary

During Combined Antiretroviral Therapy ». *AIDS Research and Human Retroviruses* 34 (1): 123-25. https://doi.org/10.1089/aid.2017.0254.

Norton, Nicholas J., Axel Fun, Mikaila Bandara, Mark R. Wills, Hoi Ping Mok, et Andrew M. L. Lever. 2017. «Innovations in the Quantitative Virus Outgrowth Assay and Its Use in Clinical Trials ». *Retrovirology* 14 (1): 58. https://doi.org/10.1186/s12977-017-0381-2.

Nowarski, Roni, Ponnandy Prabhu, Edan Kenig, Yoav Smith, Elena Britan-Rosich, et Moshe Kotler. 2014. « APOBEC3G Inhibits HIV-1 RNA Elongation by Inactivating the Viral Trans-Activation Response Element ». *Journal of Molecular Biology* 426 (15): 2840-53. https://doi.org/10.1016/j.jmb.2014.05.012.

Nyamweya, Samuel, Andrea Hegedus, Assan Jaye, Sarah Rowland-Jones, Katie L. Flanagan, et Derek C. Macallan. 2013. « Comparing HIV-1 and HIV-2 Infection: Lessons for Viral Immunopathogenesis ». *Reviews in Medical Virology* 23 (4): 221-40. https://doi.org/10.1002/rmv.1739.

Okoye, Afam A., et Louis J. Picker. 2013. «CD4+ T cell depletion in HIV infection: mechanisms of immunological failure ». *Immunological reviews* 254 (1): 54-64. https://doi.org/10.1111/imr.12066.

Oliveira, Michelli F., Antoine Chaillon, Masato Nakazawa, Milenka Vargas, Scott L. Letendre, Matthew C. Strain, Ronald J. Ellis, et al. 2017. « Early Antiretroviral Therapy Is Associated with Lower HIV DNA Molecular Diversity and Lower Inflammation in Cerebrospinal Fluid but Does Not Prevent the Establishment of Compartmentalized HIV DNA Populations ». *PLoS Pathogens* 13 (1): e1006112. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006112.

Olson, Margaret E., Reuben S. Harris, et Daniel A. Harki. 2018. «APOBEC Enzymes as Targets for Virus and Cancer Therapy». *Cell Chemical Biology* 25 (1): 36-49. https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2017.10.007.

Orlandi, Chiara, Benedetta Canovari, Federica Bozzano, Francesco Marras, Zeno Pasquini, Francesco Barchiesi, Andrea De Maria, Mauro Magnani, et Anna Casabianca. 2020. « A comparative analysis of unintegrated HIV-1 DNA measurement as a potential biomarker of the cellular reservoir in the blood of patients controlling and non-controlling viral replication ». *Journal of Translational Medicine* 18 (1): 204. https://doi.org/10.1186/s12967-020-02368-y.

Ostrowski, M. A., T. W. Chun, S. J. Justement, I. Motola, M. A. Spinelli, J. Adelsberger, L. A. Ehler, S. B. Mizell, C. W. Hallahan, et A. S. Fauci. 1999. «Both Memory and CD45RA+/CD62L+ Naive CD4(+) T Cells Are Infected in Human Immunodeficiency Virus Type 1-Infected Individuals ». *Journal of Virology* 73 (8): 6430-35. https://doi.org/10.1128/JVI.73.8.6430-6435.1999.

Palmer, Brent E., C. Preston Neff, Jonathan Lecureux, Angelica Ehler, Michelle Dsouza, Leila Remling-Mulder, Alan J. Korman, Andrew P. Fontenot, et Ramesh Akkina. 2013. « In Vivo Blockade of the PD-1 Receptor Suppresses HIV-1 Viral Loads and Improves CD4+ T Cell Levels in Humanized Mice ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 190 (1): 211- 19. https://doi.org/10.4049/jimmunol.1201108.

Pan, Ting, Zheng Song, Liyang Wu, Guangyan Liu, Xiancai Ma, Zhilin Peng, Mo Zhou, et al. 2019. « USP49 Potently Stabilizes APOBEC3G Protein by Removing Ubiquitin and Inhibits HIV-1 Replication ». *ELife* 8 (août). https://doi.org/10.7554/eLife.48318.

Pantaleo, G., C. Graziosi, J. F. Demarest, L. Butini, M. Montroni, C. H. Fox, J. M. Orenstein, D. P. Kotler, et A. S. Fauci. 1993. « HIV Infection Is Active and Progressive in Lymphoid Tissue during the Clinically Latent Stage of Disease ». *Nature* 362 (6418): 355-58. https://doi.org/10.1038/362355a0.

Pasternak, Alexander O., et Ben Berkhout. 2018. «What Do We Measure When We Measure Cell-Associated HIV RNA ». *Retrovirology* 15 (1): 13. https://doi.org/10.1186/s12977-018-0397-2.

Pasternak, Alexander O., Vladimir V. Lukashov, et Ben Berkhout. 2013. «Cell-Associated HIV RNA: A Dynamic Biomarker of Viral Persistence ». *Retrovirology* 10 (avril): 41. https://doi.org/10.1186/1742-4690-10-41.

Perelson, A. S., P. Essunger, Y. Cao, M. Vesanen, A. Hurley, K. Saksela, M. Markowitz, et
D. D. Ho. 1997. « Decay Characteristics of HIV-1-Infected Compartments during
Combination Therapy ». *Nature* 387 (6629): 188- 91. https://doi.org/10.1038/387188a0.

Perez-Toralla, Karla, Deniz Pekin, Jean-François Bartolo, Fanny Garlan, Philippe Nizard, Pierre Laurent-Puig, Jean-Christophe Baret, et Valérie Taly. 2015. « PCR digitale en microcompartiments - I. Détection sensible de séquences d'acides nucléiques rares ». *médecine/sciences* 31 (1): 84- 92. https://doi.org/10.1051/medsci/20153101017.

Persaud, Deborah, George K. Siberry, Aima Ahonkhai, Joleen Kajdas, Daphne Monie, Nancy Hutton, Douglas C. Watson, Thomas C. Quinn, Stuart C. Ray, et Robert F. Siliciano. 2004. « Continued Production of Drug-Sensitive Human Immunodeficiency Virus Type 1 in Children on Combination Antiretroviral Therapy Who Have Undetectable Viral Loads ». *Journal of Virology* 78 (2): 968- 79. https://doi.org/10.1128/jvi.78.2.968-979.2004.

Petrovas, Constantinos, Joseph P. Casazza, Jason M. Brenchley, David A. Price, Emma Gostick, William C. Adams, Melissa L. Precopio, et al. 2006. « PD-1 Is a Regulator of Virus-Specific CD8+ T Cell Survival in HIV Infection ». *The Journal of Experimental Medicine* 203 (10): 2281- 92. https://doi.org/10.1084/jem.20061496.

Pillai, Satish K., Sergei L. Kosakovsky Pond, Yang Liu, Benjamin M. Good, Matthew C. Strain, Ronald J. Ellis, Scott Letendre, et al. 2006. «Genetic Attributes of Cerebrospinal Fluid-Derived HIV-1 Env ». *Brain: A Journal of Neurology* 129 (Pt 7): 1872-83. https://doi.org/10.1093/brain/awl136.

Pires, Antonio, Gareth Hardy, Brian Gazzard, Frances Gotch, et Nesrina Imami. 2004. « Initiation of Antiretroviral Therapy during Recent HIV-1 Infection Results in Lower Residual Viral Reservoirs ». *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes (1999)* 36 (3): 783-90. https://doi.org/10.1097/00126334-200407010-00004.

Pitman, Matthew C., Jillian S. Y. Lau, James H. McMahon, et Sharon R. Lewin. 2018. « Barriers and Strategies to Achieve a Cure for HIV ». *The Lancet. HIV* 5 (6): e317-28. https://doi.org/10.1016/S2352-3018(18)30039-0.

Ploquin, Mickaël J., Yoann Madec, Armanda Casrouge, Nicolas Huot, Caroline Passaes, Camille Lécuroux, Asma Essat, et al. 2016. «Elevated Basal Pre-Infection CXCL10 in Plasma and in the Small Intestine after Infection Are Associated with More Rapid HIV/SIV Disease Onset ». *PLOS Pathogens* 12 (8): e1005774. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005774.

Pollpeter, Darja, Maddy Parsons, Andrew E. Sobala, Sashika Coxhead, Rupert D. Lang, Annie M. Bruns, Stelios Papaioannou, et al. 2018. «Deep Sequencing of HIV-1 Reverse Transcripts Reveals the Multifaceted Antiviral Functions of APOBEC3G ». *Nature Microbiology* 3 (2): 220- 33. https://doi.org/10.1038/s41564-017-0063-9.

Poveda, Eva, Verónica Briz, et Vincent Soriano. 2005. «Enfuvirtide, the First Fusion Inhibitor to Treat HIV Infection ». *AIDS Reviews* 7 (3): 139-47.

Prins, H. a. B., A. Verbon, C. a. B. Boucher, et C. Rokx. 2017. «Ending the Epidemic: Critical Role of Primary HIV Infection ». *The Netherlands Journal of Medicine* 75 (8): 321-27.

Qi, Jinxin, Chengchao Ding, Xian Jiang, et Yong Gao. 2020. « Advances in Developing CAR T-Cell Therapy for HIV Cure ». *Frontiers in Immunology* 11: 361. https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00361.

Rai, Mohammad A., Sam Pannek, et Carl J. Fichtenbaum. 2018. «Emerging Reverse Transcriptase Inhibitors for HIV-1 Infection ». *Expert opinion on emerging drugs* 23 (2): 149-57. https://doi.org/10.1080/14728214.2018.1474202.

Rhee, Soo-Yon, Philip M Grant, Philip L Tzou, Geoffrey Barrow, P Richard Harrigan, John P A Ioannidis, et Robert W Shafer. 2019. « A systematic review of the genetic mechanisms of dolutegravir resistance ». *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 74 (11): 3135-49. https://doi.org/10.1093/jac/dkz256.

Richetta, Clémence, Sylvain Thierry, Eloise Thierry, Paul Lesbats, Delphine Lapaillerie, Soundasse Munir, Frédéric Subra, et al. 2019. « Two-Long Terminal Repeat (LTR) DNA Circles Are a Substrate for HIV-1 Integrase ». *The Journal of Biological Chemistry* 294 (20): 8286-95. https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.006755.

Roberts, Lindi, Jo-Ann S. Passmore, Carolyn Williamson, Francesca Little, Lisa M. Bebell, Koleka Mlisana, Wendy A. Burgers, et al. 2010. «Plasma Cytokine Levels during Acute HIV-1 Infection Predict HIV Disease Progression ». *AIDS (London, England)* 24 (6): 819-31. https://doi.org/10.1097/QAD.0b013e3283367836.

Rodriguez, Christophe, Marie Laure Nere, Vanessa Demontant, Isabelle Charreau, Mélanie Mercier-Darty, Héloïse Delagreverie, Maud Salmona, et al. 2018. « Ultra-Deep Sequencing Improves the Detection of Drug Resistance in Cellular DNA from HIV-Infected Patients on ART with Suppressed Viraemia ». *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 73 (11): 3122- 28. https://doi.org/10.1093/jac/dky315.

Rodríguez-Muñoz, Jesús, et Santiago Moreno. 2019. «Strategies for the Cure of HIV Infection ». *Enfermedades Infecciosas Y Microbiologia Clinica* 37 (4): 265-73. https://doi.org/10.1016/j.eimc.2018.01.007.

Roquebert, B., F. Damond, F. Brun-Vézinet, et D. Descamps. 2009. « Diversité génétique des VIH et ses conséquences ». *Pathologie Biologie*, Virus émergents, 57 (2): 142-48. https://doi.org/10.1016/j.patbio.2008.04.004.

Rosenberg, E. S., J. M. Billingsley, A. M. Caliendo, S. L. Boswell, P. E. Sax, S. A. Kalams, et B. D. Walker. 1997. «Vigorous HIV-1-Specific CD4+ T Cell Responses Associated with

Control of Viremia ». *Science (New York, N.Y.)* 278 (5342): 1447-50. https://doi.org/10.1126/science.278.5342.1447.

Rouzioux, Christine, et Véronique Avettand-Fénoël. 2009. « La quantification de l'ADN-VIH : où, comment, pourquoi ? » *Virologie* 13 (2): 15-23. https://doi.org/10.1684/vir.2009.0237.

Rouzioux, Christine, Véronique Avettand-Fénoël, et Antoine Cheret. 2017. « Diagnosis and treatment of HIV primary infection: the earlier, the better ! » *La Revue Du Praticien* 67 (8): 892-95.

Rouzioux, Christine, Jean-Baptiste Hubert, Marianne Burgard, Christiane Deveau, Cécile Goujard, Marc Bary, Daniel Séréni, et al. 2005. « Early Levels of HIV-1 DNA in Peripheral Blood Mononuclear Cells Are Predictive of Disease Progression Independently of HIV-1 RNA Levels and CD4+ T Cell Counts ». *The Journal of Infectious Diseases* 192 (1): 46-55. https://doi.org/10.1086/430610.

Sabin, Caroline A., et Jens D. Lundgren. 2013. « The Natural History of HIV Infection ».CurrentOpinioninHIVandAIDS8(4):311- 17.https://doi.org/10.1097/COH.0b013e328361fa66.

Sadowski, Ivan, et Farhad B. Hashemi. 2019. « Strategies to Eradicate HIV from Infected Patients: Elimination of Latent Provirus Reservoirs ». *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS* 76 (18): 3583- 3600. https://doi.org/10.1007/s00018-019-03156-8.

Sáez-Cirión, Asier, Charline Bacchus, Laurent Hocqueloux, Véronique Avettand-Fenoel, Isabelle Girault, Camille Lecuroux, Valerie Potard, et al. 2013. «Post-Treatment HIV-1 Controllers with a Long-Term Virological Remission after the Interruption of Early Initiated Antiretroviral Therapy ANRS VISCONTI Study ». *PLoS Pathogens* 9 (3): e1003211. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003211.

Sanchez-Martinez, Alexandra, Federico Perdomo-Celis, Liliana Acevedo-Saenz, Maria T. Rugeles, et Paula A. Velilla. 2019. « Cytotoxic CD4+ T-Cells during HIV Infection: Targets 165 or Weapons? » *Journal of Clinical Virology: The Official Publication of the Pan American Society for Clinical Virology* 119 (octobre): 17-23. https://doi.org/10.1016/j.jcv.2019.08.004.

Santé Publique France. 2020. « https://www.santepubliquefrance.fr/maladies-ettraumatismes/infections-sexuellement-transmissibles/vih-sida/donnees/#tabs », 1 décembre 2020.

Schacker, T., S. Little, E. Connick, K. Gebhard-Mitchell, Z. Q. Zhang, J. Krieger, J. Pryor, et al. 2000. «Rapid Accumulation of Human Immunodeficiency Virus (HIV) in Lymphatic Tissue Reservoirs during Acute and Early HIV Infection: Implications for Timing of Antiretroviral Therapy ». *The Journal of Infectious Diseases* 181 (1): 354-57. https://doi.org/10.1086/315178.

Schnell, Gretja, Richard W. Price, Ronald Swanstrom, et Serena Spudich. 2010. « Compartmentalization and Clonal Amplification of HIV-1 Variants in the Cerebrospinal Fluid during Primary Infection ». *Journal of Virology* 84 (5): 2395-2407. https://doi.org/10.1128/JVI.01863-09.

Scott-Algara, Daniel, Christine Rouzioux, Stéphane Blanche, Marianne Burgard, Céline Didier, Yves Rivière, et Florence Buseyne. 2010. « In Untreated HIV-1-Infected Children, PBMC-Associated HIV DNA Levels and Cell-Free HIV RNA Levels Are Correlated to Distinct T-Lymphocyte Populations ». *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes* (1999) 53 (5): 553- 63. https://doi.org/10.1097/QAI.0b013e3181cf060f.

Shaik, Md Munan, Hanqin Peng, Jianming Lu, Sophia Rits-Volloch, Chen Xu, Maofu Liao, et Bing Chen. 2019. « Structural Basis of Coreceptor Recognition by HIV-1 Envelope Spike ». *Nature* 565 (7739): 318-23. https://doi.org/10.1038/s41586-018-0804-9.

Sharkey, Mark, Karine Triques, Daniel R. Kuritzkes, et Mario Stevenson. 2005. « In Vivo Evidence for Instability of Episomal Human Immunodeficiency Virus Type 1 CDNA ». *Journal of Virology* 79 (8): 5203- 10. https://doi.org/10.1128/JVI.79.8.5203-5210.2005.

Sheth, Prameet M., Colin Kovacs, Kimdar S. Kemal, R. Brad Jones, Janet M. Raboud, Richard Pilon, Charles la Porte, et al. 2009. « Persistent HIV RNA Shedding in Semen despite Effective Antiretroviral Therapy ». *AIDS (London, England)* 23 (15): 2050-54. https://doi.org/10.1097/QAD.0b013e3283303e04.

Silva, Ronaldo Celerino da, Ludovica Segat, et Sergio Crovella. 2011. « Role of DC-SIGN and L-SIGN Receptors in HIV-1 Vertical Transmission ». *Human Immunology* 72 (4): 305-11. https://doi.org/10.1016/j.humimm.2011.01.012.

Simon, Viviana, Veronique Zennou, Deya Murray, Yaoxing Huang, David D. Ho, et Paul D. Bieniasz. 2005. «Natural Variation in Vif: Differential Impact on APOBEC3G/3F and a Potential Role in HIV-1 Diversification ». *PLoS Pathogens* 1 (1): e6. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0010006.

Simonetti, Francesco R., et Mary F. Kearney. 2015. «Review: Influence of ART on HIV Genetics ». *Current Opinion in HIV and AIDS* 10 (1): 49-54. https://doi.org/10.1097/COH.0000000000120.

Sloan, Richard D., Daniel A. Donahue, Björn D. Kuhl, Tamara Bar-Magen, et Mark A. Wainberg. 2010. « Expression of Nef from unintegrated HIV-1 DNA downregulates cell surface CXCR4 and CCR5 on T-lymphocytes ». *Retrovirology* 7 (1): 44. https://doi.org/10.1186/1742-4690-7-44.

Sloan, Richard D., et Mark A. Wainberg. 2011. «The Role of Unintegrated DNA in HIV Infection ». *Retrovirology* 8 (juillet): 52. https://doi.org/10.1186/1742-4690-8-52.

Smed-Sörensen, Anna, et Karin Loré. 2011. « Dendritic Cells at the Interface of Innate and Adaptive Immunity to HIV-1 ». *Current Opinion in HIV and AIDS* 6 (5): 405-10. https://doi.org/10.1097/COH.0b013e328349b06b.

Smith, Steven J., Xue Zhi Zhao, Dario Oliveira Passos, Dmitry Lyumkis, Terrence R. Burke, et Stephen H. Hughes. 2021. « Integrase Strand Transfer Inhibitors Are Effective Anti-HIV Drugs ». *Viruses* 13 (2). https://doi.org/10.3390/v13020205.

Soogoor, Malini, et Eric S. Daar. 2005. « Primary HIV-1 infection: Diagnosis, pathogenesis, and treatment ». *Current Infectious Disease Reports* 7 (2): 147-53. https://doi.org/10.1007/s11908-005-0075-0.

Soulie, Cathia, Diane Descamps, Maxime Grudé, Véronique Schneider, Mary-Anne Trabaud, Laurence Morand-Joubert, Constance Delaugerre, et al. 2015. « Antiretroviral-Naive and - Treated HIV-1 Patients Can Harbour More Resistant Viruses in CSF than in Plasma ». *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 70 (2): 566- 72. https://doi.org/10.1093/jac/dku419.

Sperk, Maike, Robert van Domselaar, et Ujjwal Neogi. 2018. «Immune Checkpoints as the Immune System Regulators and Potential Biomarkers in HIV-1 Infection ». *International Journal of Molecular Sciences* 19 (7). https://doi.org/10.3390/ijms19072000.

Spivak, Adam M., et Vicente Planelles. 2018. « Novel Latency Reversal Agents for HIV-1 Cure ». *Annual Review of Medicine* 69 (janvier): 421- 36. https://doi.org/10.1146/annurev-med-052716-031710.

Stacey, Andrea R., Philip J. Norris, Li Qin, Elizabeth A. Haygreen, Elizabeth Taylor, John Heitman, Mila Lebedeva, et al. 2009. « Induction of a Striking Systemic Cytokine Cascade Prior to Peak Viremia in Acute Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection, in Contrast to More Modest and Delayed Responses in Acute Hepatitis B and C Virus Infections ». *Journal of Virology* 83 (8): 3719- 33. https://doi.org/10.1128/JVI.01844-08.

Stefic, Karl, Antoine Chaillon, Mélanie Bouvin-Pley, Alain Moreau, Martine Braibant, Frédéric Bastides, Guillaume Gras, Louis Bernard, et Francis Barin. 2017. « Probing the Compartmentalization of HIV-1 in the Central Nervous System through Its Neutralization Properties ». *PloS One* 12 (8): e0181680. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0181680.

Steingrover, Radjin, Katalyn Pogány, Evian Fernandez Garcia, Suzanne Jurriaans, Kees Brinkman, Hanneke Schuitemaker, Frank Miedema, Joep Ma Lange, et Jan M. Prins. 2008. « HIV-1 Viral Rebound Dynamics after a Single Treatment Interruption Depends on Time of Initiation of Highly Active Antiretroviral Therapy ». *AIDS (London, England)* 22 (13): 1583-88. https://doi.org/10.1097/QAD.0b013e328305bd77.

Stingele, K., J. Haas, T. Zimmermann, R. Stingele, C. Hübsch-Müller, M. Freitag, B. Storch-Hagenlocher, M. Hartmann, et B. Wildemann. 2001. « Independent HIV Replication in Paired CSF and Blood Viral Isolates during Antiretroviral Therapy ». *Neurology* 56 (3): 355-61. https://doi.org/10.1212/wnl.56.3.355.

Strain, Matthew C., Susan J. Little, Eric S. Daar, Diane V. Havlir, Huldrych F. Gunthard, Ruby Y. Lam, Otto A. Daly, et al. 2005. « Effect of Treatment, during Primary Infection, on Establishment and Clearance of Cellular Reservoirs of HIV-1 ». *The Journal of Infectious Diseases* 191 (9): 1410- 18. https://doi.org/10.1086/428777.

Sturdevant, Christa Buckheit, Sarah B. Joseph, Gretja Schnell, Richard W. Price, Ronald Swanstrom, et Serena Spudich. 2015. « Compartmentalized Replication of R5 T Cell-Tropic HIV-1 in the Central Nervous System Early in the Course of Infection ». *PLoS Pathogens* 11 (3): e1004720. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004720.

Swingler, Simon, Angela M Mann, Jin Zhou, Catherine Swingler, et Mario Stevenson. 2007. « Apoptotic Killing of HIV-1–Infected Macrophages Is Subverted by the Viral Envelope Glycoprotein ». *PLoS Pathogens* 3 (9). https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0030134.

Thierry, Sylvain, Soundasse Munir, Eloïse Thierry, Frédéric Subra, Hervé Leh, Alessia Zamborlini, Dyana Saenz, et al. 2015. « Integrase inhibitor reversal dynamics indicate unintegrated HIV-1 dna initiate de novo integration ». *Retrovirology* 12 (1): 24. https://doi.org/10.1186/s12977-015-0153-9.

Thornhill, John, Jamie Inshaw, Soonita Oomeer, Pontiano Kaleebu, David Cooper, Gita Ramjee, Mauro Schechter, et al. 2014. « Enhanced Normalisation of CD4/CD8 Ratio with Early Antiretroviral Therapy in Primary HIV Infection ». *Journal of the International AIDS Society* 17 (4 Suppl 3): 19480. https://doi.org/10.7448/IAS.17.4.19480.

Tian, Xiaoling, Anli Zhang, Chao Qiu, Wei Wang, Yu Yang, Chenli Qiu, Aiping Liu, et al. 2015. «The Upregulation of LAG-3 on T Cells Defines a Subpopulation with Functional Exhaustion and Correlates with Disease Progression in HIV-Infected Subjects ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 194 (8): 3873-82. https://doi.org/10.4049/jimmunol.1402176.

Timité-Konan, A. M., P. Fassinou, L. Adonis-Koffy, et B. B. N'dja. 2003. « [Use of antiretroviral drugs in HIV infected children in a tropical area: a real benefit] ». *Archives De Pediatrie: Organe Officiel De La Societe Francaise De Pediatrie* 10 (9): 831-32. https://doi.org/10.1016/s0929-693x(03)00400-7.

Titanji, Kehmia, Vijayakumar Velu, Lakshmi Chennareddi, Matam Vijay-Kumar, Andrew T. Gewirtz, Gordon J. Freeman, et Rama R. Amara. 2010. « Acute Depletion of Activated Memory B Cells Involves the PD-1 Pathway in Rapidly Progressing SIV-Infected Macaques ». *The Journal of Clinical Investigation* 120 (11): 3878-90. https://doi.org/10.1172/JCI43271.

Tomaras, Georgia D., Nicole L. Yates, Pinghuang Liu, Li Qin, Genevieve G. Fouda, Leslie L. Chavez, Allan C. Decamp, et al. 2008. « Initial B-Cell Responses to Transmitted Human Immunodeficiency Virus Type 1: Virion-Binding Immunoglobulin M (IgM) and IgG Antibodies Followed by Plasma Anti-Gp41 Antibodies with Ineffective Control of Initial Viremia ». *Journal of Virology* 82 (24): 12449- 63. https://doi.org/10.1128/JVI.01708-08.

Trautmann, Lydie. 2016. «Kill: Boosting HIV-Specific Immune Responses ». *Current Opinion in HIV and AIDS* 11 (4): 409- 16. https://doi.org/10.1097/COH.0000000000286.

Trautmann, Lydie, Loury Janbazian, Nicolas Chomont, Elias A. Said, Sylvain Gimmig, Benoit Bessette, Mohamed-Rachid Boulassel, et al. 2006. « Upregulation of PD-1 Expression on HIV-Specific CD8+ T Cells Leads to Reversible Immune Dysfunction ». *Nature Medicine* 12 (10): 1198- 1202. https://doi.org/10.1038/nm1482.

Trémeaux, Pauline, Tiphaine Lenfant, Faroudy Boufassa, Asma Essat, Adeline Mélard, Marine Gousset, Olivier Delelis, et al. 2019. « Increasing Contribution of Integrated Forms to Total HIV DNA in Blood during HIV Disease Progression from Primary Infection ». *EBioMedicine* 41 (mars): 455- 64. https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2019.02.016.

Trémeaux, Pauline, Christine Rouzioux, et Véronique Avettand-Fènoël. 2019. « [Cell and tissue reservoirs of HIV-1: dynamics during infection] ». *Virologie (Montrouge, France)* 23 (4): 211- 28. https://doi.org/10.1684/vir.2019.0784.

Tsai, Perry, Guoxin Wu, Caroline E. Baker, William O. Thayer, Rae Ann Spagnuolo, Rosa Sanchez, Stephanie Barrett, et al. 2016. « In Vivo Analysis of the Effect of Panobinostat on Cell-Associated HIV RNA and DNA Levels and Latent HIV Infection ». *Retrovirology* 13 (1): 36. https://doi.org/10.1186/s12977-016-0268-7.

Turner, Tiffany, Qiujia Shao, Weiran Wang, Yudi Wang, Chenliang Wang, Ballington Kinlock, et Bindong Liu. 2016. «Differential Contributions of Ubiquitin-Modified APOBEC3G Lysine Residues to HIV-1 Vif-Induced Degradation ». *Journal of Molecular Biology* 428 (17): 3529- 39. https://doi.org/10.1016/j.jmb.2016.05.029.

UNAIDS. 2020. « https://www.unaids.org/en/resources/fact-sheet », 1 décembre 2020.

Valcour, Victor, Thep Chalermchai, Napapon Sailasuta, Mary Marovich, Sukalaya Lerdlum, Duanghathai Suttichom, Nijasri C. Suwanwela, et al. 2012. «Central Nervous System Viral Invasion and Inflammation during Acute HIV Infection ». *The Journal of Infectious Diseases* 206 (2): 275-82. https://doi.org/10.1093/infdis/jis326.

Valera, María-Soledad, Laura de Armas-Rillo, Jonathan Barroso-González, Serena Ziglio, Julien Batisse, Noé Dubois, Sara Marrero-Hernández, et al. 2015. «The HDAC6/APOBEC3G Complex Regulates HIV-1 Infectiveness by Inducing Vif Autophagic Degradation ». *Retrovirology* 12 (juin): 53. https://doi.org/10.1186/s12977-015-0181-5.

Van Zyl, Gert U., Mary Grace Katusiime, Ann Wiegand, William R. McManus, Michael J. Bale, Elias K. Halvas, Brian Luke, et al. 2017. « No Evidence of HIV Replication in Children 171 on Antiretroviral Therapy ». *The Journal of Clinical Investigation* 127 (10): 3827-34. https://doi.org/10.1172/JCI94582.

Vancoillie, Leen, Laura Hebberecht, Kenny Dauwe, Els Demecheleer, Sylvie Dinakis, Dries Vaneechoutte, Virginie Mortier, et Chris Verhofstede. 2017. « Longitudinal Sequencing of HIV-1 Infected Patients with Low-Level Viremia for Years While on ART Shows No Indications for Genetic Evolution of the Virus ». *Virology* 510 (octobre): 185-93. https://doi.org/10.1016/j.virol.2017.07.010.

Vanhems, P., B. Hirschel, A. N. Phillips, D. A. Cooper, J. Vizzard, J. Brassard, et L. Perrin. 2000. « Incubation Time of Acute Human Immunodeficiency Virus (HIV) Infection and Duration of Acute HIV Infection Are Independent Prognostic Factors of Progression to AIDS ». *The Journal of Infectious Diseases* 182 (1): 334- 37. https://doi.org/10.1086/315687.

Vansant, Gerlinde, Anne Bruggemans, Julie Janssens, et Zeger Debyser. 2020. « Block-And-Lock Strategies to Cure HIV Infection ». *Viruses* 12 (1). https://doi.org/10.3390/v12010084.

Velu, Vijayakumar, Ravi Dyavar Shetty, Marie Larsson, et Esaki M. Shankar. 2015. « Role of PD-1 Co-Inhibitory Pathway in HIV Infection and Potential Therapeutic Options ». *Retrovirology* 12 (février): 14. https://doi.org/10.1186/s12977-015-0144-x.

Venturi, G., M. Catucci, L. Romano, P. Corsi, F. Leoncini, P. E. Valensin, et M. Zazzi. 2000. « Antiretroviral Resistance Mutations in Human Immunodeficiency Virus Type 1 Reverse Transcriptase and Protease from Paired Cerebrospinal Fluid and Plasma Samples ». *The Journal of Infectious Diseases* 181 (2): 740- 45. https://doi.org/10.1086/315249.

Viard, Jean-Paul, Marianne Burgard, Jean-Baptiste Hubert, Laurent Aaron, Cécile Rabian, Nathalie Pertuiset, Maria Lourenço, Chantal Rothschild, et Christine Rouzioux. 2004. « Impact of 5 Years of Maximally Successful Highly Active Antiretroviral Therapy on CD4 Cell Count and HIV-1 DNA Level ». *AIDS (London, England)* 18 (1): 45-49. https://doi.org/10.1097/00002030-200401020-00005. Visseaux, Benoit, Lambert Assoumou, Nadia Mahjoub, Maxime Grude, Mary-Anne Trabaud, Stéphanie Raymond, Marc Wirden, et al. 2020. « Surveillance of HIV-1 Primary Infections in France from 2014 to 2016: Toward Stable Resistance, but Higher Diversity, Clustering and Virulence? » *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 75 (1): 183-93. https://doi.org/10.1093/jac/dkz404.

Visseaux, Benoît, Quentin Le Hingrat, Florence Damond, Charlotte Charpentier, et Diane Descamps. 2019. « [Physiopathology of HIV-2 infection] ». *Virologie (Montrouge, France)* 23 (5): 277- 91. https://doi.org/10.1684/vir.2019.0789.

Vranckx, Lenard S., Jonas Demeulemeester, Suha Saleh, Annegret Boll, Gerlinde Vansant, Rik Schrijvers, Caroline Weydert, et al. 2016. « LEDGIN-Mediated Inhibition of Integrase-LEDGF/P75 Interaction Reduces Reactivation of Residual Latent HIV ». *EBioMedicine* 8 (juin): 248- 64. https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2016.04.039.

Wang, Zheng, Francesco R. Simonetti, Robert F. Siliciano, et Gregory M. Laird. 2018. « Measuring Replication Competent HIV-1: Advances and Challenges in Defining the Latent Reservoir ». *Retrovirology* 15 (1): 21. https://doi.org/10.1186/s12977-018-0404-7.

Wei, Xiping, Julie M. Decker, Shuyi Wang, Huxiong Hui, John C. Kappes, Xiaoyun Wu, Jesus F. Salazar-Gonzalez, et al. 2003. « Antibody Neutralization and Escape by HIV-1 ». *Nature* 422 (6929): 307 - 12. https://doi.org/10.1038/nature01470.

Wen, Ying, Katharine J. Bar, et Jonathan Z. Li. 2018. «Lessons Learned from HIV Antiretroviral Treatment Interruption Trials ». *Current Opinion in HIV and AIDS* 13 (5): 416-21. https://doi.org/10.1097/COH.00000000000484.

WHO. 2020. « https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/hiv-aids », 30 octobre 2020.

Wong, Joseph K., et Steven A. Yukl. 2016. « Tissue Reservoirs of HIV ». *Current Opinion in HIV and AIDS* 11 (4): 362-70. https://doi.org/10.1097/COH.0000000000293.

Wong, Michelle E., Anthony Jaworowski, et Anna C. Hearps. 2019. « The HIV Reservoir in Monocytes and Macrophages ». *Frontiers in Immunology* 10: 1435. https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01435.

Woodham, Andrew W., Joseph G. Skeate, Adriana M. Sanna, Julia R. Taylor, Diane M. Da Silva, Paula M. Cannon, et W. Martin Kast. 2016. « Human Immunodeficiency Virus Immune Cell Receptors, Coreceptors, and Cofactors: Implications for Prevention and Treatment ». *AIDS Patient Care and STDs* 30 (7): 291- 306. https://doi.org/10.1089/apc.2016.0100.

Wu, L., W. A. Paxton, N. Kassam, N. Ruffing, J. B. Rottman, N. Sullivan, H. Choe, et al. 1997. « CCR5 Levels and Expression Pattern Correlate with Infectability by Macrophage-Tropic HIV-1, in Vitro ». *The Journal of Experimental Medicine* 185 (9): 1681-91. https://doi.org/10.1084/jem.185.9.1681.

Wu, Yuntao. 2004. «HIV-1 Gene Expression: Lessons from Provirus and Non-Integrated DNA ». *Retrovirology* 1 (juin): 13. https://doi.org/10.1186/1742-4690-1-13.

Wykes, Michelle N., et Sharon R. Lewin. 2018. « Immune Checkpoint Blockade in InfectiousDiseases ».NatureReviews.Immunology18(2):91-104.https://doi.org/10.1038/nri.2017.112.

Xu, Wendy Kaichun, Hyewon Byun, et Jaquelin P. Dudley. 2020. « The Role of APOBECs in Viral Replication ». *Microorganisms* 8 (12). https://doi.org/10.3390/microorganisms8121899.

Yang, Bin, Keyang Chen, Chune Zhang, Sophia Huang, et Hui Zhang. 2007. « Virion-Associated Uracil DNA Glycosylase-2 and Apurinic/Apyrimidinic Endonuclease Are Involved in the Degradation of APOBEC3G-Edited Nascent HIV-1 DNA ». *The Journal of Biological Chemistry* 282 (16): 11667-75. https://doi.org/10.1074/jbc.M606864200.

Yerly, S., T. V. Perneger, S. Vora, B. Hirschel, et L. Perrin. 2000. « Decay of Cell-Associated HIV-1 DNA Correlates with Residual Replication in Patients Treated during Acute HIV-1 Infection ». *AIDS (London, England)* 14 (18): 2805-12. https://doi.org/10.1097/00002030-200012220-00001.

Yoder, Kristine E., et Richard Fishel. 2006. « PCR-Based Detection Is Unable to Consistently Distinguish HIV 1LTR Circles ». *Journal of Virological Methods* 138 (1-2): 201-6. https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2006.07.022.

Yoshida, Yuki, Masakazu Honma, Yasuaki Kimura, et Hiroshi Abe. 2020. « Structure, Synthesis and Inhibition Mechanism of Nucleoside Analogues as HIV-1 Reverse Transcriptase Inhibitors (NRTIs) ». *ChemMedChem*, novembre. https://doi.org/10.1002/cmdc.202000695.

Yukl, Steven A., Sara Gianella, Elizabeth Sinclair, Lorrie Epling, Qingsheng Li, Lijie Duan, Alex L. M. Choi, et al. 2010. « Differences in HIV Burden and Immune Activation within the Gut of HIV-Positive Patients Receiving Suppressive Antiretroviral Therapy ». *The Journal of Infectious Diseases* 202 (10): 1553- 61. https://doi.org/10.1086/656722.

Yukl, Steven A., Amandeep K. Shergill, Terence Ho, Maudi Killian, Valerie Girling, Lorrie Epling, Peilin Li, et al. 2013. «The Distribution of HIV DNA and RNA in Cell Subsets Differs in Gut and Blood of HIV-Positive Patients on ART: Implications for Viral Persistence ». *The Journal of Infectious Diseases* 208 (8): 1212-20. https://doi.org/10.1093/infdis/jit308.

Zalar, Alberto, Maria Ines Figueroa, Beatriz Ruibal-Ares, Patricia Baré, Pedro Cahn, Maria Marta de E. de Bracco, et Liliana Belmonte. 2010. «Macrophage HIV-1 Infection in Duodenal Tissue of Patients on Long Term HAART ». *Antiviral Research* 87 (2): 269-71. https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2010.05.005.

Zhou, Tong, Yongxi Chen, Li Hao, et Yanyun Zhang. 2006. «DC-SIGN and Immunoregulation ». *Cellular & Molecular Immunology* 3 (4): 279-83.

Zhu, Jinfang. 2018. «T Helper Cell Differentiation, Heterogeneity, and Plasticity ». *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 10 (10). https://doi.org/10.1101/cshperspect.a030338.

Zyl, Gert U. van, Margaret A. Bedison, Anita Janse van Rensburg, Barbara Laughton, MarkF. Cotton, et John W. Mellors. 2015. «Early Antiretroviral Therapy in South African 175 Children Reduces HIV-1-Infected Cells and Cell-Associated HIV-1 RNA in Blood Mononuclear Cells ». *The Journal of Infectious Diseases* 212 (1): 39-43. https://doi.org/10.1093/infdis/jiu827.

Zyl, Gert van, Michael J. Bale, et Mary F. Kearney. 2018. «HIV Evolution and Diversity in ART-Treated Patients ». *Retrovirology* 15 (1): 14. https://doi.org/10.1186/s12977-018-0395-4.

LISTE DES PUBLICATIONS

PUBLICATIONS SUR LE VIH

Marcelin, Anne-Genevieve, Charlotte Charpentier, Pantxika Bellecave, <u>Basma Abdi</u>, Marie-Laure Chaix, Virginie Ferre, Stephanie Raymond, et al. «Factors Associated with the Emergence of Integrase Resistance Mutations in Patients Failing Dual or Triple Integrase Inhibitor-Based Regimens in a French National Survey ». The Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 7 juin 2021, dkab193. <u>https://doi.org/10.1093/jac/dkab193</u>.

Palich, R., M. Wirden, G. Peytavin, M.-P. Lê, S. Seang, <u>**B. Abdi**</u>, L. Schneider, et al. « **Persistent Low-Level Viraemia in Antiretroviral Treatment-Experienced Patients Is Not Linked to Viral Resistance or Inadequate Drug Concentrations** ». The Journal of Antimicrobial Chemotherapy 75, no 10 (1 octobre 2020): 2981-85. <u>https://doi.org/10.1093/jac/dkaa273</u>.

E, Giatsou, <u>Abdi B,</u> Plu I, Desire N, Palich R, Calvez V, Seilhean D, Marcelin Ag, et Jary A. « Ultradeep Sequencing Reveals HIV-1 Diversity and Resistance Compartmentalization during HIV-Encephalopathy ». AIDS (London, England) 34, no 11 (9 janvier 2020). https://doi.org/10.1097/QAD.0000000002616

C, Soulie, Assoumou L, <u>Abdi B</u>, Sayon S, Nguyen T, Valantin Ma, Beniguel L, et al. « Characterization of Viral Rebounds on Dual Etravirine/Raltegravir Maintenance Therapy (ANRS-163 ETRAL Trial) ». The Journal of Antimicrobial Chemotherapy 75, no 7 (7 janvier 2020). https://doi.org/10.1093/jac/dkaa090.

Soulie, Cathia, Maria Mercedes Santoro, Alexandre Storto, <u>Basma Abdi</u>, Charlotte Charpentier, Daniele Armenia, Aude Jary, et al. « **Prevalence of Doravirine-Associated Resistance Mutations in HIV-1-Infected Antiretroviral-Experienced Patients from Two Large Databases in France and Italy** ». The Journal of Antimicrobial Chemotherapy 75, no 4 (1 avril 2020): 1026- 30. https://doi.org/10.1093/jac/dkz553.

Malet, Isabelle, Olivier Delelis, Thuy Nguyen, Valentin Leducq, <u>Besma Abdi</u>, Laurence Morand-Joubert, Vincent Calvez, et Anne-Geneviève Marcelin. « Variability of the HIV-1 **3' Polypurine Tract (3'PPT) Region and Implication in Integrase Inhibitor Resistance** ». The Journal of Antimicrobial Chemotherapy 74, no 12 (1 décembre 2019): 3440-44. https://doi.org/10.1093/jac/dkz377.

Palich, Romain, Roland Tubiana, <u>Besma Abdi</u>, Fouzi Mestari, Marguerite Guiguet, Françoise Imbert-Bismut, Christine Katlama, Dominique Bonnefont-Rousselot, et Corinne Isnard-Bagnis. « Plasma Cystatin C as a Marker for Estimated Glomerular Filtration Rate Assessment in HIV-1-Infected Patients Treated with Dolutegravir-Based ART ». The Journal of Antimicrobial Chemotherapy 73, no 7 (1 juillet 2018): 1935-39. https://doi.org/10.1093/jac/dky112.

PUBLICATIONS SUR LE SARS-COV-2

Teyssou, Elisa, Cathia Soulie, Benoit Visseaux, Sidonie Lambert-Niclot, Valentine Ferre, Stéphane Marot, Aude Jary, et al. « The 501Y.V2 SARS-CoV-2 Variant Has an Intermediate Viral Load between the 501Y.V1 and the Historical Variants in Nasopharyngeal Samples from Newly Diagnosed COVID-19 Patients ». *The Journal of Infection* 83, n^o 1 (juillet 2021): 119-45. https://doi.org/10.1016/j.jinf.2021.04.023.

Cousyn, L., B. Sellem, R. Palich, D. Bendetowicz, R. Agher, C. Delorme, R. Tubiana, et al. « Olfactory and Gustatory Dysfunctions in COVID-19 Outpatients: A Prospective Cohort Study ». Infectious Diseases Now, 22 mars 2021. https://doi.org/10.1016/j.idnow.2021.03.004.

Faury, Hélène, Camille Courboulès, Mathilde Payen, Aude Jary, Pierre Hausfater, CharlesEdouard Luyt, Martin Dres, et al. « Medical Features of COVID-19 and Influenza

Infection: A Comparative Study in Paris, France ». The Journal of Infection 82, no 2 (février 2021): e36- 39. https://doi.org/10.1016/j.jinf.2020.08.017.

Nadal, Marine, Ludovic Lassel, Michel Denis, Aude Gibelin, Sandra Fournier, Laurent Menard, Hélène Goulet, <u>Basma Abdi</u>, Muriel Farthoukh, et Gilles Pialoux. « **Role of Super-Spreader Phenomenon in a Covid-19 Cluster among Healthcare Workers in a Primary Care Hospital** ». Journal of Infection, 10 février 2021. https://doi.org/10.1016/j.jinf.2021.02.009.

Laurenge, Alice, Renata Ursu, Caroline Houillier, <u>Basma Abdi</u>, Gianpiero Tebano, Cyril Quemeneur, Sylvain Choquet, et al. «SARS-CoV-2 Infection in Patients with Primary Central Nervous System Lymphoma ». Journal of Neurology, 2 janvier 2021. https://doi.org/10.1007/s00415-020-10311-w.

Jary, Aude, Valentin Leducq, Isabelle Malet, Stéphane Marot, Elise Klement-Frutos, Elisa Teyssou, Cathia Soulié, <u>Basma ABDI</u> et al. « Evolution of viral quasispecies during SARS-CoV-2 infection ». Clinical Microbiology and Infection 26, no 11 (novembre 2020): 1560.e1-1560.e4. https://doi.org/10.1016/j.cmi.2020.07.032.

M, Wirden, Feghoul L, Bertine M, Nere Ml, Le Hingrat Q, <u>Abdi B</u>, Boutolleau D, et al. « **Multicenter Comparison of the Cobas 6800 System with the RealStar RT-PCR Kit for the Detection of SARS-CoV-2** ». Journal of Clinical Virology : The Official Publication of the Pan American Society for Clinical Virology 130 (septembre 2020). https://doi.org/10.1016/j.jcv.2020.104573.
RESUME : L'infection par le virus de l'immunodéficience humaine de type 1 (VIH-1) est caractérisée par sa vaste diversité génétique et son évolution rapide qui influencent sa pathogenèse et sa gestion clinique. La diversité génétique du VIH-1 est due en grande partie aux erreurs de la transcriptase inverse, au phénomène de recombinaison, à l'évolution génétique des populations virales au cours du temps, à la compartimentation virale et aux hypermutations médiées par les enzymes cellulaires APOBEC3. La compréhension de tous ces facteurs dont l'interaction définit l'étendu de la diversité génétique, est primordiale afin de mieux caractériser les réservoirs viraux aidant à développer et à optimiser des nouvelles stratégies thérapeutiques d'éradication du virus ou de rémission fonctionnelle. Nous avons étudié de façon qualitative et quantitative l'évolution longitudinale du réservoir au niveau périphérique chez des patients diagnostiqués et traités rapidement durant la primo-infection (PHI) pendant au moins cinq ans sans aucun rebond virologique. Nous avons mis en évidence une diminution rapide et continue des niveaux d'ADN VIH chez ces patients jusqu'à l'atteinte des niveaux très bas. Nous avons démontré l'absence d'arguments en faveur de l'évolution et de la diversité virale chez ces patients. Nos résultats renforcent l'importance de l'initiation rapide de la thérapie antirétrovirale afin de limiter la taille du réservoir et bloquer son évolution au cours du temps. Afin d'étudier la compartimentation chez des patients virémiques, nous avons comparé les mutations de résistance aux inhibiteurs de l'intégrase entre le sang et le système nerveux central. Nous avons montré pour la première fois, l'absence de différence significative des mutations de résistance entre ces deux compartiments, confirmant l'absence de compartimentation chez certains patients virémiques. Finalement, afin de mieux comprendre les facteurs liés à l'activité des apolipoprotéines APOBEC3, nous avons analysé les paramètres cliniques et immuno-virologiques pouvant être associés à des mutations de résistances résultant des transitions (G) vers (A) chez un grand nombre de patients VIH-1 bien contrôlés virologiquement. Nous avons montré pour la première fois une corrélation indépendante entre l'activité des protéines APOBEC3 avec une petite taille du réservoir viral et avec le sous-type non B.

ABSTRACT : The hallmark of HIV-1 infection is the vast genetic diversity and rapid progression, which influence its pathogenesis and its clinical management. The genetic diversity of HIV-1 is due to the lack of a proofreading mechanism in the reverse transcriptase, the viral recombination, the genetic evolution of viral populations over time, viral compartmentalization and host APOBECmediated hypermutation. Considering all of these factors is essential in order to better characterize viral reservoirs, to design and optimize new eradication strategies. We have analyzed longitudinal blood samples from patients diagnosed and treated quickly during PHI and with strict effective long-term antiretroviral therapy. We have shown significant decay of HIV DNA over time and the absence of genetic divergence and diversity during the follow up period. Our results reinforce the importance of the rapid initiation of antiretroviral therapy in order to limit the size of the reservoir and to block its evolution over time. To study compartmentalization in viraemic patients, we compared drug resistance mutations to integrase strand transfer inhibitors between the blood and the central nervous system. We have shown for the first time the absence of a significant difference in drug resistance mutations between these two compartments. Finally, in order to better understand factors linked to APOBEC3 activities, we analyzed the clinical and immuno-virological parameters that may be associated with drug resistance mutations resulting from (G) to (A) transitions in a large number of well-controlled HIV-1 patients. We have shown for the first time an independent association between the presence of G-to-A mutations and stop codons with HIV-1 subtype non-B and low proviral DNA.