



**HAL**  
open science

## Définition d'épitopes CTL dans l'ADN VIH-1 archivé et présentables par le HLA-B : perspective vaccinale

Marine Jourdain

► **To cite this version:**

Marine Jourdain. Définition d'épitopes CTL dans l'ADN VIH-1 archivé et présentables par le HLA-B : perspective vaccinale. Sciences pharmaceutiques. 2018. dumas-02018388

**HAL Id: dumas-02018388**

**<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-02018388>**

Submitted on 13 Feb 2019

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

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

**Université de Bordeaux**

**UFR DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES**

Année 2018

N°76

MEMOIRE du DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES de BIOLOGIE MEDICALE

Thèse pour l'obtention du

**DIPLOME d'ETAT de DOCTEUR EN PHARMACIE**

Présentée et soutenue publiquement

Par Marine Jourdain

Née le 19 novembre 1989 à Rennes

**DÉFINITION D'ÉPITOPES CTL DANS L'ADN VIH-1 ARCHIVÉ ET  
PRÉSENTABLES PAR LE HLA-B : PERSPECTIVE VACCINALE**

Le 31 Août 2018

Directeur de thèse : Monsieur le Professeur Hervé FLEURY

**JURY**

Pr Dubois Véronique	Pharmacien Biologiste PU-PH	Président
Pr Fleury Hervé	Médecin Biologiste PU-PH	Directeur
Pr Bonnet Fabrice	Médecin Infectiologue PU-PH	Juge
Dr Guidicelli Gwendaline	Pharmacien Biologiste PH	Juge

**Au Professeur Véronique DUBOIS,**  
Professeur des universités - Praticien hospitalier,  
Laboratoire de bactériologie du CHU de Bordeaux.

Tout d'abord, je vous remercie de me faire l'honneur de présider ce jury de thèse et d'avoir accepté de juger ce travail. Ensuite, je tiens à vous remercier pour tout ce que j'ai pu apprendre à vos côtés pendant mon internat, pour votre gentillesse et votre bonne humeur en toutes circonstances. Ce fut un réel plaisir de travailler avec vous.

**Au Professeur Hervé FLEURY,**  
Professeur des universités - Praticien hospitalier,  
Laboratoire de virologie du CHU de Bordeaux.

Je vous adresse mes sincères remerciements pour avoir accepté de diriger cette thèse. Je vous remercie pour votre disponibilité, votre implication hors norme et vos précieux conseils tout au long de l'élaboration de ce travail : j'ai vraiment apprécié de faire cette thèse sous votre tutelle. J'espère sincèrement que nos chemins se recroiseront par la suite, peut-être outre-mer ?

**Au Professeur Fabrice BONNET,**  
Professeur des universités - Praticien hospitalier,  
Service de Médecine Interne et Maladies Infectieuses du CHU de Bordeaux (Saint-André).

Pour l'honneur que vous me faites d'avoir accepté de faire partie du jury de cette thèse et pour le temps que vous aurez accordé à la lecture critique de ce travail. Veuillez trouver ici le témoignage de ma très profonde gratitude.

**Au Docteur Gwendaline GUIDICELLI**  
Praticien hospitalier,  
Laboratoire d'immunologie et d'immunogénétique du CHU de Bordeaux.

Je vous remercie sincèrement d'avoir accepté d'examiner et de juger ce travail. Je tiens aussi à vous exprimer ma reconnaissance pour votre aide, vos conseils et votre gentillesse lors de la préparation de cette thèse. Soyez assurée de ma profonde gratitude et de ma grande considération.

### **A l'équipe Provir,**

Un grand merci à Camille, Pantxika et Patricia pour leur aide dans la réalisation de ce travail de thèse. Une note particulière pour Camille, qui même submergée de travail entre son poste d'AHU et le rendu de sa thèse de science, a toujours trouvé un créneau pour répondre à mes questions et repasser mes séquences dans la Tutumachine 😊. Merci.

### **Aux biologistes et techniciens rencontrés au cours de mon internat,**

Merci pour tout ce que j'ai pu apprendre à vos côtés et qui fera de moi, je l'espère, une bonne biologiste. J'ai vraiment apprécié toutes ces années. J'en profite également pour remercier Myriam, technicienne au HLA pour m'avoir enseigné les techniques de typage HLA nécessaires pour ce travail de thèse.

### **A ma Famille,**

**François-Xavier**, je tenais à commencer par toi... un sincère merci pour ton soutien et ta patience lors de l'écriture de cette thèse. Tu as été comme toujours de très bon conseil et je t'en suis reconnaissante. A tes côtés, je suis tout simplement comblée. J'ai hâte de devenir ta femme et la mère de notre petite gargouille.

**Maman**, je te remercie de m'avoir toujours soutenue et de l'amour que tu m'as toujours porté. Sans toi, rien de tout ça n'aurait été possible. Tu as toujours été là pour moi, pour nous. Je ne t'ai sûrement jamais assez remerciée d'être une maman aussi formidable alors j'en profite aujourd'hui : merci pour tout.

**Papy et Mamy**, je vous remercie également pour votre soutien depuis ma plus tendre enfance, mais surtout lors de ces 10 années d'études. Vous avez toujours été là, et m'avez accompagnée dans tous mes projets. Je me souviendrai à jamais de mes semaines de révisions chez vous 😊 !  
Merci !

**Caroline, ma tante**, un grand merci pour l'aide que tu m'as apportée dans la relecture de ce travail. Merci aussi à toi et **Gilles** d'être de supers tatata et tontonton depuis toujours. Je vous embrasse.

Je tiens aussi à remercier mon **père**, j'espère que tu seras fier de moi ! mon super petit frère **Ced** qui m'a également toujours soutenu et **Bertrand** mon beau-père qui est aussi toujours là quand il y a besoin.

## A mes amis,

**Laura**, ma plus vieille copine ! C'est enfin la fin de ma 20<sup>ème</sup> année de pharma comme tu dis !! C'est bon, maintenant tu pourras dire à ta maman que c'est terminé ! Et ça un peu grâce à toi qui m'a soutenue mais surtout supportée pendant ces plus de 25 années d'amitié ☺. On s'est rencontrées sur le toboggan de la moyenne section et aujourd'hui, le jour où je deviens Docteur, tu es encore là ! Quelle histoire ... ! Une page se tourne, une nouvelle commence ... Encore tellement d'aventures à venir ! ♥♥♥

**Mes amis d'enfance : Thomas, Hugo, Céline, Biv de Biv, Arthur, Sep plus malin que malinge, ce bon Erwan Gueheeeeenec, Gico, Bat, Lulu, Cam et Jol Jol mais aussi Chloé, Boubou, Angèle, Constance...** Il y a tellement à dire ... que je ne sais pas où commencer ! On s'est rencontrés au lycée pour la plupart d'entre vous et depuis... on en a fait !! D'abord les chouilles à Saint Goust', puis on a eu les scooters → direction Carnac !! Puis le permis !!! On a alors commencé à explorer le monde ensemble (Les Sables-d'Olonne, Lacanau, Rennes, La Baule, Bali !!!, la Croatie, la Corse ...!) et c'est loin d'être fini !! Un grand merci à tous de m'avoir soutenue pendant toutes ces années et d'être là encore aujourd'hui avec moi pour passer le cap vers ma nouvelle vie de docteur ;) Quelle chance de tous vous avoir ! Je vous aime !

**Mes amis de Fac : Flo, Didine, Cec', Anne-Laure, Alex, Thomas, Guido, Nono, Hélène, Claire, Klervi, Mailys, Marc, Irina, Thib ...** Cette année fut une année de thèse... et c'est enfin à mon tour de vous dédicacer cette thèse ! Un grand merci pour tous les bons moments qu'on a passé ensemble lors de notre fac mais aussi pour toutes nos retrouvailles annuelles ou biennuelles qui perdureront je l'espère, jusqu'à ce qu'on soit vieux, et même très vieux !! Je passe le relais... la thèse à qui le tour ?! (Thomas ? Tib ?!!) A très bientôt !

### **Mes co-internes et amis rencontrés lors de cet internat de folie !**

→ **Flo** (♥, encore), **Clémence** (♥), **Cyrielle** (♥) et **Marion** (♥): Mes supers copines Bordelaises ☺ Je crois qu'on peut le dire, on aura bien rigolé pendant ces 5 ans de folie ! Merci pour tous ces moments inoubliables passés ensemble : les millions de bars à vin, de plages, de soirées internat, de chutes de vélo, de week-ends au ski et ailleurs, de baby-foot endiablés et même de matchs de foot^^ ! Je vais rejoindre Flo à Lyon mais une partie de mon cœur reste avec vous ;) !! Pour le meilleur et pour le pire, je vous aime ;)

→ **Morgane** (Tu nous manques !!, reviens nous voir le plus souvent possible), **Sylvain** (j'espère que tu m'as pardonnée pour Messi^^), **Samy et Marine** (pour les meilleurs fajitas de la semaine ski^^ et merci pour les titres bleus !!), **Alex et Barni** (pour toutes ces soirées jusqu'au bout de la nuit !), **Pierre-Yves** (mention spéciale pour notre super coloc ☺), **Stéphane P** (merci pour nos séances de boost pour écrire cette thèse ;)), **Adrien Fabre** (le meilleur des co-internes !!), **Julien E** (Merci pour m'avoir fait venir à Dax et m'avoir enseigné ton savoir en hémato) mais aussi **Manu et Morgane** (futurs voisins :D), **JG** (le plus bronzé ;), **Chloé** (pour ces 10 ans passés sur les bancs de l'« école » ensemble finalement !), **Céline, Lolo, Justine B, Pierre M, Thierry, Camille P, Catherine, Arnaud ... et tous les autres co-internes que j'ai pu croiser au cours de mon internat et que je n'ai pas cités ici !!!**

**Merci à tous !!**

# SOMMAIRE

<b>LISTES DES ABREVIATIONS .....</b>	<b>8</b>
<b>LISTE DES FIGURES .....</b>	<b>11</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX .....</b>	<b>12</b>
<b>INTRODUCTION .....</b>	<b>13</b>
<b>REVUE DE LA LITTERATURE.....</b>	<b>15</b>
<b>1. Le virus du VIH-1 et le SIDA.....</b>	<b>15</b>
1.1 Origine et découverte du virus de l'immunodéficience humaine .....	15
1.2 Diversité du virus de l'immunodéficience humaine .....	16
1.3 Répartition du VIH-1 dans le monde.....	18
1.4 Epidémiologie.....	19
<b>2. VIH-1 : structure et organisation du génome .....</b>	<b>20</b>
<b>3. Cycle de réplication du VIH-1 .....</b>	<b>23</b>
<b>4. Physiopathologie de l'infection par le VIH-1 .....</b>	<b>27</b>
4.1 La primo-infection .....	28
4.2 La phase asymptomatique .....	28
4.3 Le stade SIDA.....	28
4.4 Cas particulier des patients « controllers » .....	29
<b>5. Le réservoir du VIH-1 .....</b>	<b>30</b>
5.1 Définition du réservoir viral .....	30
5.2 Mécanisme d'établissement de la latence .....	31
5.3 Maintien du réservoir quiescent.....	32
<b>6. « HIV cure » : comment peut-on espérer se débarrasser du VIH ? .....</b>	<b>34</b>
6.1 La guérison "virologique" .....	35
6.1.1 La greffe de moelle osseuse.....	35
6.1.2 La thérapie génique.....	35
6.1.3 Réversion de la latence virale : « Shock and Kill » .....	36
6.2 La guérison "fonctionnelle" .....	37
6.2.1 Initiation d'un TAR la plus précoce possible .....	37
6.2.2 La stratégie « Block and Lock » .....	38
6.2.3 L'immunothérapie.....	39
6.2.4 Vaccination thérapeutique .....	40
<b>7. La réponse CTL HLA-classe I restreinte au cours de l'infection par le VIH-1 .....</b>	<b>43</b>
7.1 Importance des CTL au cours de l'infection par le VIH-1.....	43

7.2	Bases moléculaires de la réponse CTL : HLA et épitopes.....	44
7.3	HLA de classe I et progression de la maladie .....	46
7.4	Echappement moléculaire et évolution de la réponse cytotoxique.....	47
7.5	Epitopes CTL du VIH-1 .....	48
<b>OBJECTIFS DE L'ETUDE .....</b>		<b>49</b>
<b>MATERIELS ET METHODES.....</b>		<b>50</b>
<b>1.</b>	<b>Population étudiée.....</b>	<b>50</b>
1.1	Population source .....	50
1.2	Critères d'inclusion dans l'étude.....	50
1.3	Recueil de données .....	50
<b>2.</b>	<b>Typage HLA de classe I locus B .....</b>	<b>51</b>
2.1	PCR SSO reverse LUMINEX.....	51
2.2	PCR SSP.....	51
<b>3.</b>	<b>Séquençage de l'ADN proviral.....</b>	<b>52</b>
3.1	Principe du séquençage par la méthode Sanger .....	52
3.2	Tests génotypiques de résistance sur ADN proviral réalisés au CHU de Bordeaux.....	53
<b>4.</b>	<b>Calcul du MHC IC<sub>50</sub> et logiciel TutuGenetics .....</b>	<b>54</b>
<b>RESULTATS .....</b>		<b>56</b>
<b>1.</b>	<b>Sélection des patients inclus dans l'étude .....</b>	<b>56</b>
<b>2.</b>	<b>Caractéristiques clinico-biologiques des patients inclus dans l'étude .....</b>	<b>58</b>
<b>3.</b>	<b>Identification sélective d'épitopes CTL conservés restreints aux molécules HLA-B .....</b>	<b>60</b>
3.1	Analyse de la RT .....	61
3.1.1	Épitopes restreints au HLA-B*07:02 .....	61
3.1.2	Épitopes restreints au HLA-B*08:01 .....	63
3.1.3	Épitopes restreints au HLA-B*44:02 et 44:03 .....	65
3.1.4	Épitopes restreints au HLA-B*35:01 .....	66
3.1.5	Épitopes restreints au HLA-B*15:01 .....	68
3.1.6	Épitopes restreints au HLA-B*18:01 .....	70
3.1.7	Épitopes restreints au HLA-B*51:01 .....	71
3.1.8	Épitopes restreints au HLA-B*53:01 .....	72
3.2	Analyse de l'INT.....	74
3.3	Analyse de la PR .....	76
<b>4.</b>	<b>Analyse globale et sélection des peptides vaccinaux.....</b>	<b>78</b>
<b>5.</b>	<b>Visualisation 3D des peptides épitopiques .....</b>	<b>80</b>
<b>DISCUSSION .....</b>		<b>81</b>

<b>CONCLUSION &amp; PERSPECTIVES .....</b>	<b>87</b>
<b>ANNEXES .....</b>	<b>88</b>
<b>ANNEXE 1 – Extrait de la liste des épitopes CTL les mieux définis « A-list » .....</b>	<b>88</b>
<b>ANNEXE 2 – Caractéristiques des patients de l'étude .....</b>	<b>89</b>
<b>ANNEXE 3 - Liste d'abréviations des acides aminés .....</b>	<b>91</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE.....</b>	<b>92</b>
<b>SERMENT DE GALIEN.....</b>	<b>100</b>



## LISTES DES ABREVIATIONS

aa : Acides Aminés

ADN : Acide Désoxyribonucléique

AFND : Allele Frequency Net Database

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

APOBEC3G : Apolipoprotein B Editing Complex 3G

ARN : Acide Ribonucléique

ARNm : ARN messagers

BDCEL : Best-Defined CTL Epitopes List

bNAbs : Broadly Neutralizing Antibodies

$\beta$ 2m :  $\beta$ 2-microglobuline

CA : Capside Virale = p24

CHU : Centre Hospitalier Universitaire

CCR5 : C-C Chemokine Receptor type 5

CD : Cellules Dendritiques

CDC : Centers For Disease Control and Prevention

CTL : Lymphocyte T CD8+ cytotoxique

CMH : Complexe Majeur d'histocompatibilité

CPI : Complexe de Pré-Intégration

CRF : Circulating Recombinant Form

CRISPR/Cas9 : Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/CRISPR Associated protein 9

CTL-4 : Cytolytic T-Lymphocyte Antigen 4

CV : Charge Virale

CVS : Comma-Separated Values

CXCR4 : C-X-C Chemokine Receptor type 4

dCA : Didehydro-Cortistatin A

ddnTP : Didésoxynuléotides

dNTPs : DéoxyNucléotide Triphosphates

ELISpot : Enzyme-Linked ImmunoSpot

ESCRT : Endosomal Sorting Complex Required for Transport

gag : Group-specific antigen

GALT : Tissu lymphoïde associé au tube digestif

HDACi : Histones Déacétylases

HLA : Human Leukocyte Antigen

IC<sub>50</sub> : Indice théorique de présentation qui correspond à la concentration inhibitrice nécessaire pour déplacer 50% d'un ligand de haute affinité

IEDB : Immune Epitope Database

IFN : Interféron

IL : Interleukine

INNTI : inhibiteurs non nucléosidiques de la transcriptase inverse

INT : Intégrase

LAR : Agents Réverseurs de Latence

LTR : Long Terminal Repeat

MA : protéines de MAtrice = p17

MHC IC<sub>50</sub> = IC<sub>50</sub> (Major Histocompatibility Complex Inhibitory Concentration)

NC : Nucléocapside

Nef : NEgative regulatory Factor)

NF-kB : Nuclear Factor Kappa B

NGS : Next Generation Sequencing

NHP : Primates non humains

NK : Natural Killer

ONUSIDA : Programme Commun des Nations Unies sur le VIH/SIDA

ORF : Open Reading Frame

PCR : Polymerase Chain Reaction

PCR-SSO : Polymerase Chain Reaction Sequence Specific Oligonucleotides

PCR-SSP : Polymerase Chain Reaction Single Specific Primer

PD-1 : Programmed Cell Death 1

Pol : ADN polymérase

PR : Protéase Virale

PREP : Prophylaxie Pré-Exposition

PVVIH : Personnes Vivant avec le VIH

RCPG : Récepteurs Couplés aux Protéines G

Rev : Regulator of Expression of Viral proteins

RNA : Réseaux neuronaux artificiels

RT : Reverse Transcriptase = Transcriptase Inverse

SIDA : Syndrome d'ImmunoDéficiency Acquis

SNC : Système nerveux central

TALEN : Transcription Activator-like Effector Nuclease

TAP : Transporter Associated Antigen Protein

TAR : Traitement antirétroviral

Tat : Trans-Activator of Transcription

TCR : T Cell Receptor

TCD8 : Lymphocytes T cytotoxiques

URF : Unique Recombinant Form

Vif : Viral Infectivity Factor

VIH : Virus de l'immunodéficience Humaine

VIS : Virus de l'Immunodéficience Simienne

Vpr : Viral Protein R

Vpu : Viral Protein U

ZFN : Zinc Finger Nucleases

## LISTE DES FIGURES

Figure 1 - Phylogénie des VIH-1 et origine géographique.....	16
Figure 2 - Distribution des sous-types et des formes recombinantes du VIH-1 M dans le monde....	18
Figure 3 - Représentation schématique de la structure du VIH-1 .....	20
Figure 4 - Génome annoté de la souche de référence du VIH-1 : HXB2.....	21
Figure 5 - Cycle de réplication du VIH-1.....	26
Figure 6 - Évolution naturelle de l'infection par le VIH-1.....	27
Figure 7 - Différents types d'évolution de la maladie VIH .....	29
Figure 8 - Réservoirs anatomiques du VIH-1 .....	31
Figure 9 - Expansion clonale du VIH-1 à partir de sites d'intégration identiques.....	33
Figure 10 - Principe de la stratégie « Shock and Kill » .....	36
Figure 11 - Principe de la stratégie « Block and Lock ».....	38
Figure 12 - Réponses immunitaires à médiation humorale et cellulaire lors de l'infection par le VIH-1.....	43
Figure 13 - Présentation des antigènes par le CMH de classe I .....	44
Figure 14 - Conformation des peptides pouvant lier les molécules du CMH de classe I .....	45
Figure 15 - Analyses des épitopes CTL optimaux du VIH-1 répertoriés au sein de la base de données de Los Alamos.....	48
Figure 16 - Principe de fonctionnement du logiciel TutuGenetics .....	55
Figure 17 - Schéma de l'étude.....	57
Figure 18 - Répartition des allèles HLA-B majoritaires chez les patients étudiés.....	59
Figure 19 - Peptides retenus pour la composition du cocktail vaccinal thérapeutique en fonction des allèles B .....	79
Figure 20 - Localisation des différents épitopes sélectionnés au sein de la RT .....	80

## LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 - Types, groupes et sous types du VIH .....	17
Tableau 2 - Protéines régulatrices et protéines accessoires du VIH-1 .....	22
Tableau 3 - Deux types de guérison du VIH-1 : guérison virologique et fonctionnelle .....	34
Tableau 4 - Résumé des nouvelles stratégies thérapeutiques du VIH-1.....	42
Tableau 5 - Associations entre progression de l'infection à VIH-1 et allèles HLA-I correspondants adapté d'après Goulder et al. 2012 <sup>119</sup> .....	47
Tableau 6 - Allèles HLA-B les plus représentés dans la population caucasienne et la population africaine .....	56
Tableau 7 - Principales caractéristiques clinico-biologiques des patients inclus dans l'étude .....	58
Tableau 8 - Nombre de gènes séquencés en fonction du HLA-B des patients de la cohorte .....	60
Tableau 9 - Épitope restreint par le HLA-B*07:02 présentant un IC <sub>50</sub> < 50 nM.....	61
Tableau 10 - Épitopes restreints par le HLA-B*07:02 présentant un IC <sub>50</sub> < 500 nM .....	62
Tableau 11 - Épitope restreint par le HLA-B*08:01 présentant un IC <sub>50</sub> < 50 nM.....	63
Tableau 12 : Épitopes restreints par le HLA-B*08:01 présentant un IC <sub>50</sub> < 500 nM .....	64
Tableau 13 - Épitopes restreints par le HLA-B*44:02 et HLA-B*44:03 .....	66
Tableau 14 - Épitopes restreints par le HLA-B*35:01 présentant un IC <sub>50</sub> < 50 nM.....	67
Tableau 15 - Épitopes restreints par le HLA-B*35:01 présentant un IC <sub>50</sub> < 500 nM .....	68
Tableau 16 - Épitopes restreints par le HLA-B*15:01 présentant un IC <sub>50</sub> < 50 nM.....	68
Tableau 17 - Épitopes restreints par le HLA-B*15:01 présentant un IC <sub>50</sub> < 500 nM.....	70
Tableau 18 - Épitopes restreints par le HLA-B*18:01 présentant un IC <sub>50</sub> < 500 nM .....	71
Tableau 19 - Épitope RT(128-135) chez les patients HLA-B*51:01 .....	72
Tableau 20 - Épitopes restreints par le HLA-B*53:01 présentant un IC <sub>50</sub> < 500 nM .....	73
Tableau 21 – Épitopes conservés identifiés au sein de l'intégrase possédant un IC <sub>50</sub> < 50 mM .....	74
Tableau 22 - Épitopes conservés identifiés au sein de l'intégrase possédant un IC <sub>50</sub> < 500 mM .....	75
Tableau 23 - Épitopes conservés identifiés au sein de la protéase possédant un IC <sub>50</sub> < 50 mM .....	76
Tableau 24 - Épitopes conservés identifiés au sein de la protéase possédant un IC <sub>50</sub> < 500 mM.....	77
Tableau 25 - Récapitulatifs des épitopes identifiés dans l'étude .....	78

## INTRODUCTION

L'apparition des trithérapies et le développement de combinaisons d'antirétroviraux ultra-puissantes ont permis de contrôler durablement la réplication du virus de l'immunodéficience humaine 1 (VIH-1) chez les patients traités, permettant ainsi une restitution de leurs défenses immunitaires et de ramener leur espérance de vie proche de celle d'une personne non infectée. Cependant ces traitements sont coûteux, contraignants, et présentent encore des effets indésirables menant parfois à un défaut d'observance. De plus, leur arrêt conduit invariablement à la réémergence d'une réplication virale détectable, vraisemblablement à partir des réservoirs viraux.

La communauté scientifique et médicale s'intéresse maintenant à l'étape suivante : la guérison. Une stratégie pour éradiquer le virus consiste en l'élaboration d'un vaccin thérapeutique impliquant les lymphocytes T CD8+ cytotoxiques (CTL) dont l'activation nécessite la reconnaissance d'épitopes viraux par le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe I. Cependant, tous les essais vaccinaux impliquant les CTL n'ont montré que peu de succès jusqu'à aujourd'hui. Une hypothèse pouvant expliquer cet échec est le manque de spécificité des épitopes CTL utilisés dans les préparations vaccinales, qui ne prennent en compte ni la variabilité du système HLA (*Human Leukocyte Antigen*) des individus, ni la présence d'éventuels épitopes CTL mutés non reconnus au sein des réservoirs. Des études préliminaires ont permis de montrer que les épitopes CTL viraux précédemment documentés retrouvés chez des patients chroniquement infectés présentaient en effet des variations par rapport à la souche virale de référence nommée HxB2<sup>1</sup>. Ces premières observations, confirmées par d'autres<sup>2,3</sup> montrent qu'il n'est pas possible de prédire complètement quels épitopes seront reconnus par les allèles HLA des patients si des séquences et des épitopes de référence sont pris comme base pour la simulation. Ces travaux ont également montré l'importance de considérer les allèles HLA de l'hôte dans les essais vaccinaux contre le VIH. En partant de l'hypothèse que les virus archivés sous forme d'ADN proviral, constituent une partie importante de l'origine de la réplication virale émergente à l'échec ou à l'interruption du traitement antirétroviral (TAR), nous proposons dans ce travail de tenter d'identifier des épitopes CTL conservés et présentables par le HLA-B présents au sein de l'ADN proviral.

Dans une première partie, nous ferons l'état des lieux des connaissances actuelles sur le VIH-1 et des nouvelles stratégies pour le combattre dans une étude bibliographique plus approfondie. Ensuite, nous présenterons les résultats d'une étude réalisée sur des virus isolés chez des patients infectés par le VIH-1 en succès thérapeutique suivis au CHU de Bordeaux, visant à étudier la variabilité des épitopes contenus dans l'ADN proviral et à identifier des épitopes conservés présentables par le HLA-B.

Ce travail de thèse vient s'inscrire dans le cadre du projet Provir/Latitude 45, initié en 2012 par le Professeur Hervé Fleury et financé par Merck Sharpe et Dohm, qui a pour objectif final l'élaboration d'un vaccin lipopeptidique tenant compte du système HLA de l'hôte et capable de générer une réponse CTL suffisamment efficace pour contrôler la réplication virale émergente à l'arrêt du TAR.

# REVUE DE LA LITTÉRATURE

## 1. Le virus du VIH-1 et le SIDA

### 1.1 Origine et découverte du virus de l'immunodéficience humaine

Les premiers rapports de syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA) remontent au début des années 80 lorsque le Centers For Disease Control and Prevention (CDC) signale une épidémie de pneumonies à *Pneumocystis carinii* survenant dans un contexte d'immunodéficience profonde chez des homosexuels à Los Angeles aux Etats-Unis<sup>4</sup>. Des cas identiques sont rapidement décrits dans différentes régions du monde, atteignant non seulement les homosexuels, mais aussi les toxicomanes par voie veineuse, les hémophiles recevant des fractions plasmatiques ou encore les patients transfusés. Rapidement soupçonnée, l'origine virale de ce syndrome est confirmée grâce à l'isolement d'un nouveau rétrovirus humain à partir d'une biopsie ganglionnaire d'un patient présentant des signes de SIDA<sup>5</sup> par Françoise Barré-Sinoussi dans l'équipe de Pasteur Paris dirigée par le Professeur Luc Montagnier. Les deux chercheurs recevront conjointement pour cette découverte, le prix Nobel de Médecine en 2008. Initialement nommé LAV pour *Lymphadenopathy associated virus*, le virus sera ensuite renommé VIH pour *Virus de l'immunodéficience humaine*. Trois ans après, un variant du VIH-1 est isolé chez des patients originaires d'Afrique de l'Ouest : il sera nommé VIH-2<sup>6,7</sup>.

Les études phylogénétiques ont permis de montrer que les virus du VIH-1 et VIH-2 sont apparentés avec les virus des primates africains : les *Virus de l'immunodéficience simienne* (VIS). Il est aujourd'hui clairement établi que plusieurs transmissions inter-espèces de virus simiens à l'homme sont à l'origine de la pandémie. Les hypothèses les plus probables consistent à dire que la barrière d'espèce aurait été franchie lors de chasses, par des morsures de singes infectés, ou encore lors du dépeçage de ces animaux. Le virus se serait ensuite adapté à son hôte afin de pouvoir diffuser à travers la population humaine. Des études menées sur les nombreuses souches de VIS retrouvées dans des échantillons de selles provenant de singes d'origines géographiques différentes ont permis de montrer que les VIS des chimpanzés (*Pan troglodytes troglodytes* et *Pan troglodytes schweinfurthii*)<sup>8</sup> et des gorilles d'Afrique Centrale et Occidentale (*Gorilla gorilla*)<sup>9</sup> sont à l'origine du VIH-1. Les différents groupes de VIH-1 décrits actuellement seraient donc le résultat de quatre transmissions zoonotiques indépendantes, survenues il y a plus d'un siècle dans la partie ouest de l'Afrique Centrale où siègent les zones de répartition de leur réservoir<sup>10</sup>. Au moins quatre transmissions zoonotiques auraient eu lieu, donnant naissance aux 4 groupes de VIH-1 actuellement décrits (**Figure 1**). Le VIH-2 quant à lui est plus étroitement apparenté aux VISsm infectant les mangabeys enfumés (*Cercocebus atys*)<sup>11</sup> en Afrique



de l'Ouest. De la même façon que pour le VIH-1, au moins 9 transmissions inter-espèces ont été observées, conduisant à neuf groupes de VIH-2.

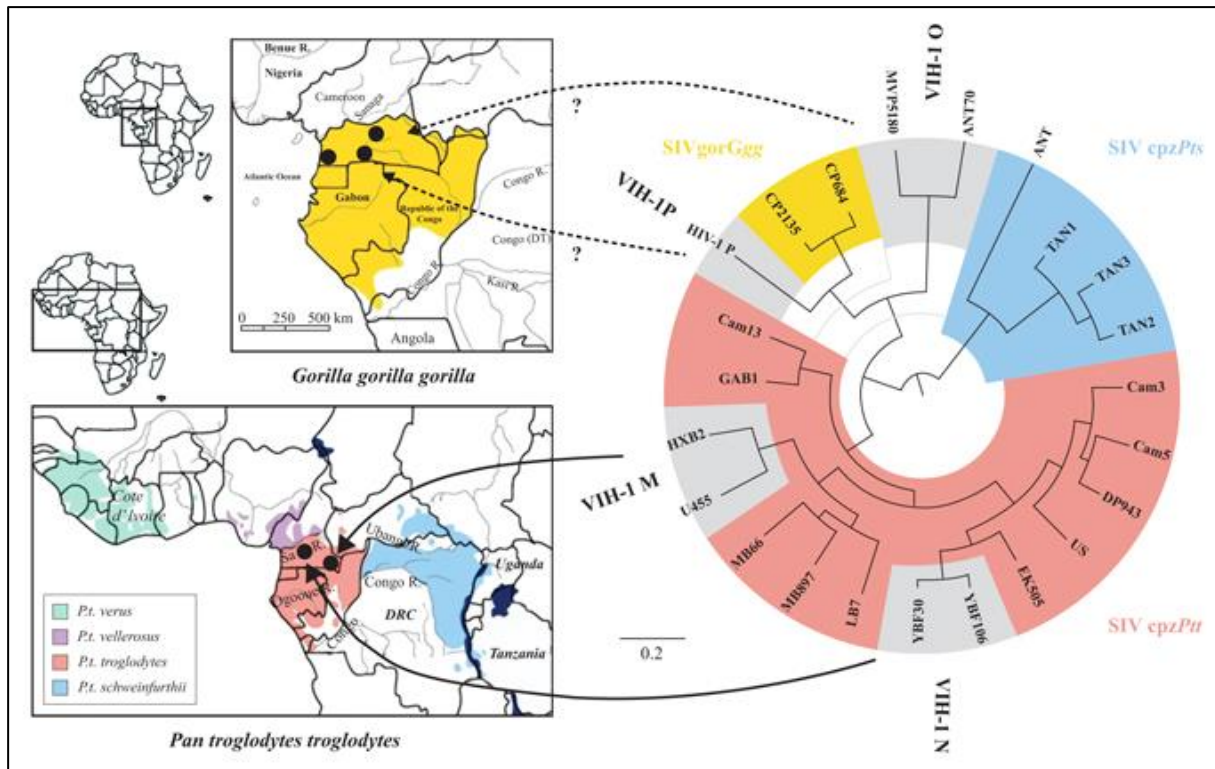


Figure 1 - Phylogénie des VIH-1 et origine géographique

d'après Leoz et al. 2017<sup>12</sup>

## 1.2 Diversité du virus de l'immunodéficience humaine

L'analyse des séquences des différentes souches a montré que le VIH-1 et, dans une moindre mesure le VIH-2, étaient caractérisés par une variabilité génomique très importante<sup>13</sup> associée à une évolution rapide. La divergence observée entre les souches est la conséquence d'un taux élevé de réplication associé à l'infidélité de la reverse transcriptase (RT), favorisant un taux de mutation et de recombinaison important. A ce jour, on distingue 4 groupes de VIH-1 : M (majeur), O (outlier), N (non M, non O ou new) et P, la vaste majorité des infections à VIH-1 dans le monde étant causée par le groupe M. Les 3 autres groupes sont retrouvés de manière beaucoup moins fréquente, cependant la raison de leur faible diffusion reste méconnue (Tableau 1).

Le groupe M est lui-même divisé en 14 sous types ou clades (A1 à A4, A6, B, C, D, F1, F2, G, H, J et K) dont les séquences nucléotidiques présentent au moins 20% de différences (source : *HIV Sequence Database*), la région codant pour les glycoprotéines de surface du virus (*env*) possédant la plus grande variabilité génétique. Aux différents sous-types, s'ajoutent des virus recombinants, provenant d'évènements de recombinaison qui surviennent dans des cellules co-infectées par différents sous-types durant l'étape de rétrotranscription. Le terme de CRF (*Circulating Recombinant Form*) est utilisé si le virus recombinant est décrit chez au moins trois personnes non reliées épidémiologiquement entre elles (exemple : le CRF02\_AG est le produit de la recombinaison d'un sous-type A avec un sous-type G). Les formes recombinantes ne répondant pas à cette règle sont qualifiées d'URF pour *Unique Recombinant Forms*. Aujourd'hui, 90 CRF différents ont été identifiés (source : HIV Sequence Database, consulté en mars 2018 <http://www.hiv.lanl.gov/>).

**Tableau 1 - Types, groupes et sous types du VIH**

Type	Groupe	Origine	Souches* (%)	Distribution	Commentaires
VIH-1	M	VIscpz	700 912 (98,83%)	Monde entier	Groupe responsable de la pandémie, Diversité génétique importante
	O	VISgor	2 110 (0,30%)	Ouest de l'Afrique Centrale	Diversité génétique importante Résistance naturelle aux INNTI
	N	VIscpz	38 (0,01%)	Cameroun	Rare, très peu de cas décrits
	P	VISgor	8 (<0,0001%)	Cameroun	Rare, très peu de cas décrits
VIH-2	/	VISsm	6160 (0,87%)	Afrique de l'Ouest/Centrale + quelques cas en Europe USA, Brésil, Japon...	Evolution plus lente Transmissibilité plus faible Résistance naturelle aux INNTI

\*données issues de la banque de séquences de Los Alamos, Mars 18 (<http://www.hiv.lanl.gov/>)

Le groupe O représente un groupe à part du fait de sa distribution limitée au Cameroun et aux pays frontaliers (Ouest de l'Afrique Centrale) ainsi que par son importante variabilité génétique qui a défini son nom (Outlier). En plus d'être naturellement résistant aux Inhibiteurs Non Nucléosidiques de la Transcriptase Inverse (INNTI), le groupe O pose des problèmes en termes de diagnostic et de suivi virologique puisqu'il nécessite des outils moléculaires spécifiques. Sa prévalence au Cameroun est estimée à 0,6% des infections à VIH-1<sup>14</sup>, mais il n'y a, à ce jour, pas d'explication quant à la diffusion limitée de ce groupe. A noter que des recombinaisons entre les groupes M et O ont été décrites<sup>15</sup>.

Les groupes N et P se retrouvent quasiment exclusivement au Cameroun. A ce jour, seuls quelques rares cas ont été décrits : une quarantaine pour le groupes N et seulement huit cas pour le groupe P<sup>16</sup>.

### 1.3 Répartition du VIH-1 dans le monde

En fonction de l'ancienneté de l'épidémie dans le pays et en raison des mouvements de populations (immigration, commerce, voyages, déploiements militaires...), la distribution des diverses formes de VIH-1 est très hétérogène (Figure 2).

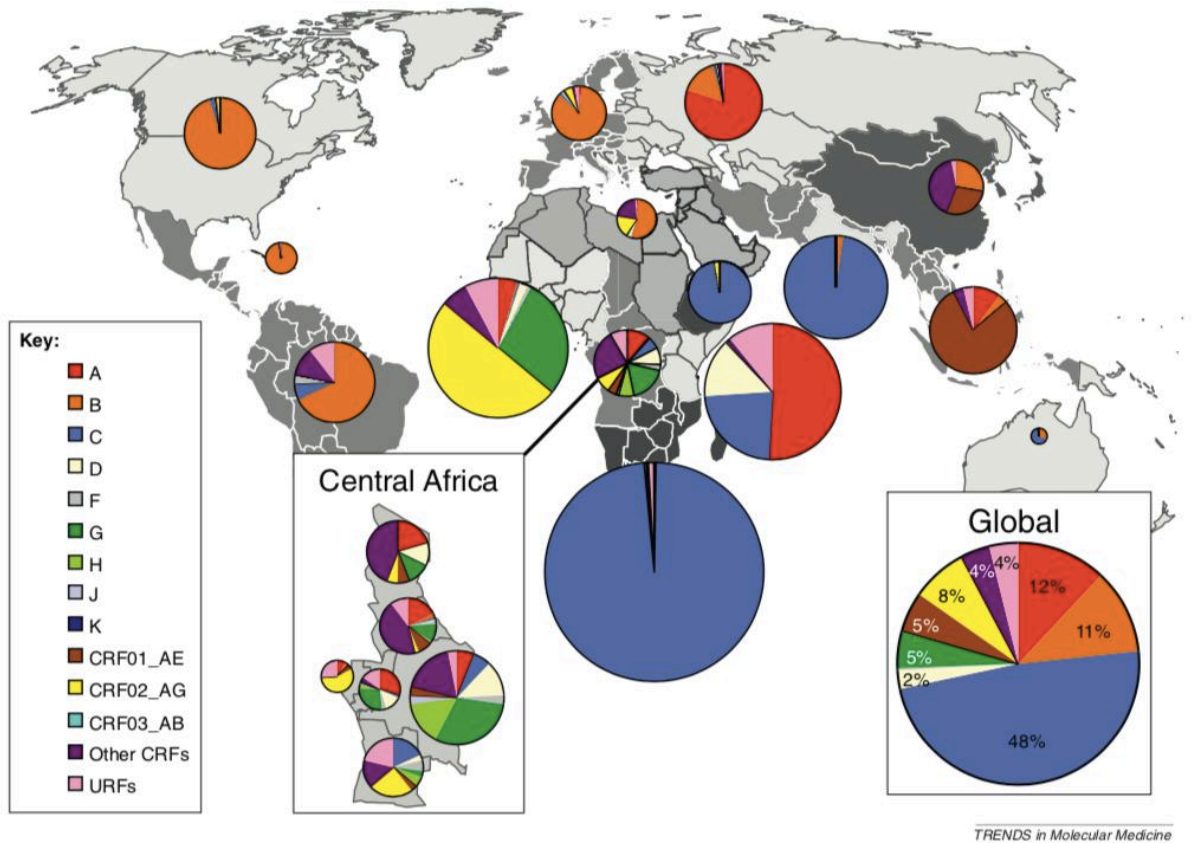


Figure 2 - Distribution des sous-types et des formes recombinantes du VIH-1 M dans le monde

D'après Hemelaar et al. 2012<sup>17</sup>

Le sous-type C est le plus représenté dans le monde : il prédomine en Inde<sup>18</sup> et est responsable de quasiment 100% des infections en Afrique Australe. Le sous-type B est majoritaire en Europe de l'Ouest, en Amérique du Nord, en Australie et en Nouvelle-Zélande, bien que la proportion de sous-types non-B et notamment les sous-types recombinants soit en évolution constante ces dernières années<sup>19,20</sup>. En Afrique subsaharienne, presque tous les sous-types et CRF sont retrouvés, tandis qu'en Afrique de l'Ouest la majorité des virus sont de type CRF02\_AG. L'Amérique du Sud est dominée par le sous-type B, mais les sous-types F et C sont également observés ainsi que des recombinants B/F. Le CRF01\_AE domine en Asie du Sud-Est, alors que les sous-types B et C ainsi que des recombinants B/C sont observés en Chine.

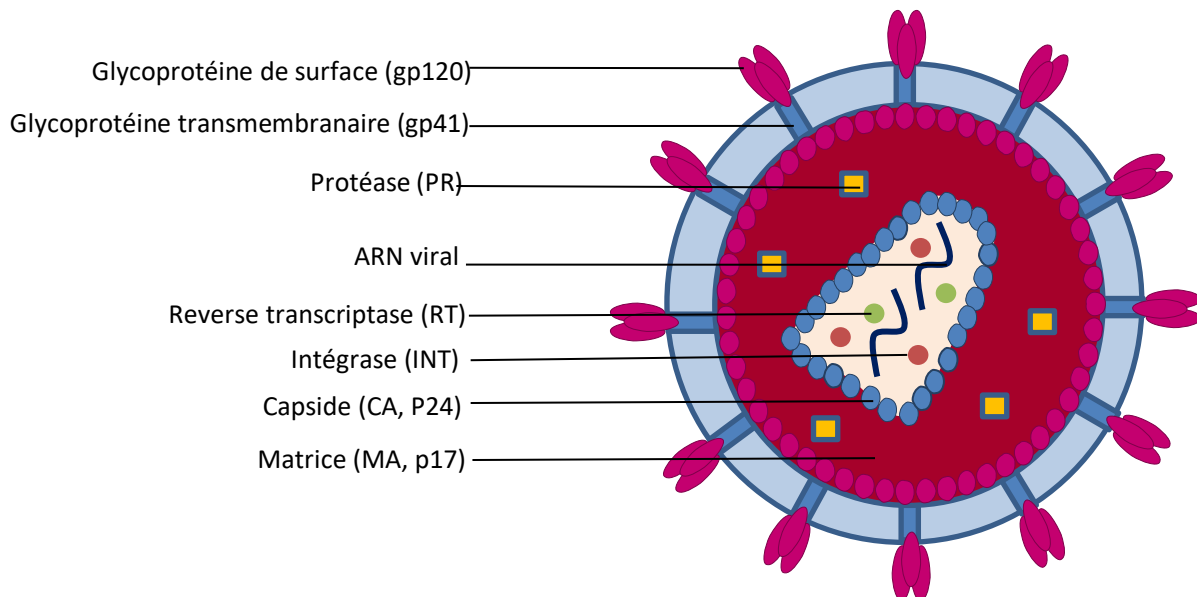
## 1.4 Epidémiologie

D'après le dernier rapport du Programme Commun des Nations Unies sur le VIH/SIDA (ONUSIDA 2016), 78 millions de personnes ont été infectées par le VIH et 35 millions sont décédées de maladies liées au sida depuis la découverte du virus il y a 35 ans. Le VIH continue de représenter de par le monde un problème majeur de santé publique, et plusieurs millions de personnes sont encore nouvellement infectées chaque année. Avec plus de 25 millions de cas, l'Afrique subsaharienne reste la région la plus touchée : le Swaziland, qui en fait partie, affiche la plus haute prévalence de VIH au monde avec un taux atteignant les 27%.

Les programmes de lutte contre le VIH, visant notamment à garantir un accès universel à la prévention, au dépistage et aux TAR, ont permis de réduire de 39% le nombre de nouvelles infections, et de baisser d'un tiers le nombre de décès liés au VIH entre 2000 et 2016. Avec pour cible ambitieuse de mettre fin à l'épidémie de SIDA d'ici à 2030, les états se sont aujourd'hui engagés à atteindre à l'horizon 2020 l'objectif 90-90-90 fixé par l'ONUSIDA en 2014. Soit : 90% de personnes porteuses du VIH informées de leur statut, 90% de personnes diagnostiquées ayant accès à un traitement antirétroviral et 90% de patients traités avec une charge virale (CV) indétectable.

## 2. VIH-1 : structure et organisation du génome

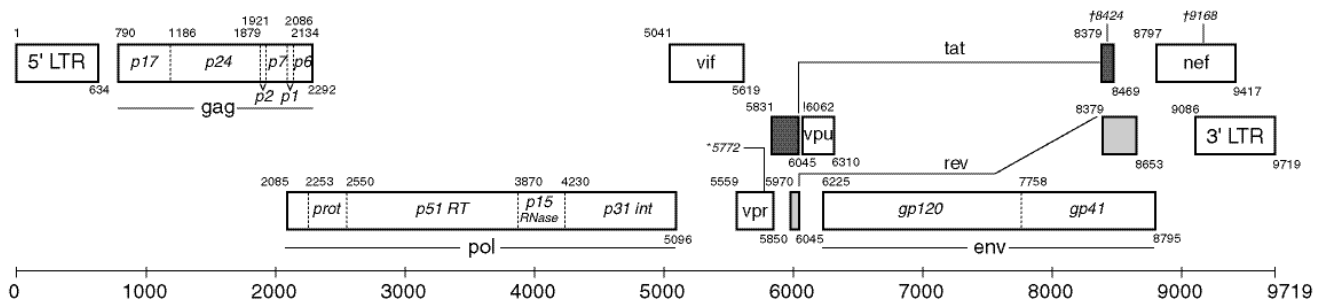
Le VIH-1 est un rétrovirus qui appartient à la famille des *Retroviridae*, du genre *Lentivirus*. Les particules rétrovirales sont de forme sphérique et ont un diamètre de 80 à 160 nm. Elles possèdent une enveloppe constituée d'une bicouche lipidique qui dérive de la cellule hôte dans laquelle sont ancrées les glycoprotéines d'enveloppe : la glycoprotéine de surface (gp120) et la glycoprotéine transmembranaire (gp41). Gp120 et gp 41 s'organisent en trimères formant une structure en spicule responsable de l'attachement des virions aux cellules cibles<sup>21</sup>. La bicouche lipidique contient également des protéines provenant de la cellule hôte (actine, protéines du complexe majeur d'histocompatibilité...). L'intérieur de la particule virale comprend une membrane interne, constituée de protéines de matrice (MA, p17) qui entourent la capside virale (CA, p24) dans laquelle se trouvent le génome viral, la nucléocapside (NC) et les enzymes nécessaires à la réplication virale (**Figure 3**).



**Figure 3 - Représentation schématique de la structure du VIH-1**

### Schéma personnel

Son génome, d'une taille d'environ 9,2 kb, est composé de deux copies d'ARN simple brin identiques. Il contient 9 gènes entourés de régions non codantes en 5' et 3' : les LTR (Long Terminal Repeat) qui sont des séquences répétées jouant un rôle important dans la transcription du génome viral et dans l'intégration de l'ADN viral dans le génome de la cellule hôte (**Figure 4**).



**Figure 4 - Génome annoté de la souche de référence du VIH-1 : HXB2**

D'après HIV sequence database (<http://www.hiv.lanl.gov/>)

On distingue 3 gènes principaux qui sont des gènes de structure :

- Le gène *gag* (group-specific antigen) qui code pour une polyprotéine gag qui donnera après clivage par la protéase virale (PR), la MA, la CA, la NC, la protéine p6 qui intervient dans la libération des virions immatures et enfin les protéines p1 et p2 qui vont avoir une action dans la régulation du taux de clivage, l'assemblage et le bourgeonnement viral.
- Le gène *pol* (ADN polymérase) qui, en association avec le gène *gag* code pour le précurseur polyprotéique gag-pol ensuite clivé par la PR aboutissant à la production des trois protéines enzymatiques virales : la RT, l'intégrase (INT) et la PR. La RT permet la conversion de l'ARN viral monocaténaire en ADN bicaténaire (ADN proviral) tandis que l'INT va permettre son intégration dans le génome de la cellule hôte. La PR permet la maturation des protéines virales par clivage des précurseurs gag et gag-pol, indispensable à la production de particules virales infectieuses.
- Le gène *env* qui code pour le précurseur glycoprotéique gp160 qui sera clivé en gp120 et gp41 composant l'enveloppe virale, et permettant l'entrée du virus dans la cellule hôte.

Les autres gènes peuvent être divisés en deux catégories :

- Les gènes codant les protéines régulatrices : *tat* (trans-activator of transcription), *rev* (regulator of expression of viral proteins) et *nef* (negative regulatory factor) qui vont intervenir dans la réplication du virus.
- Les gènes codant pour les protéines accessoires : *vpu* (viral protein U), *vpr* (viral protein R) et *vif* (viral infectivity factor) qui interviennent dans la maturation et le relargage des particules infectieuses (**Tableau 2**).

**Tableau 2 - Protéines régulatrices et protéines accessoires du VIH-1**

Gènes		Fonctions
<b><i>tat</i></b>	<i>trans-activator of transcription</i>	Régulation positive de l'expression des gènes viraux
<b><i>rev</i></b>	<i>regulator of expression of viral proteins</i>	Export des transcrits non épissés hors du noyau
<b><i>nef</i></b>	<i>negative regulatory factor</i>	Régulation négative de <i>tat</i> , <i>rev</i> et <i>nef</i> Module l'expression de CD4 et des molécules du CMH-I Augmente le pouvoir infectieux des particules virales Pro-réplicatif
<b><i>vif</i></b>	<i>viral infectivity factor</i>	Inhibe les activités antirétrovirales d'APOBEC3G
<b><i>vpr</i></b>	<i>viral protein R</i>	Module le taux de mutation viral lors de la rétrotranscription Contrôle du cycle cellulaire
<b><i>vpu</i></b>	<i>viral protein U</i>	Import nucléaire du complexe de pré-intégration (CPI) Diminue l'expression de CD4 Favorise la libération de virions

### 3. Cycle de réplication du VIH-1

Afin de se propager et survivre dans son hôte, le virus du VIH va devoir entrer au sein de la cellule hôte et utiliser la machinerie cellulaire pour établir son cycle de réplication (**Figure 5**).

L'étape initiale du cycle de réplication correspond à **l'entrée du virus dans la cellule hôte**. Il va d'abord y avoir fixation de la particule virale via la gp 120 au récepteur CD4<sup>22</sup> présent à la surface des cellules cibles. La molécule CD4 est une glycoprotéine appartenant à la superfamille des immunoglobulines qui permet notamment la reconnaissance des molécules du CMH de type II (CMH-II) présent à la surface des cellules présentatrices d'antigène. Elle est principalement exprimée à la surface des lymphocytes T auxiliaires mais on la retrouve également sur les cellules dendritiques (CD), les macrophages, les monocytes, les cellules microgliales et les cellules de Langerhans. Ainsi les principaux sites de réplication du VIH-1 vont être les organes riches en lymphocytes c'est à dire les organes lymphoïdes primaires et secondaires : thymus, rate, ganglion lymphatique, les tissus lymphoïdes associés aux muqueuses, notamment le GALT (tissu lymphoïde associé au tube digestif). La réplication virale a également lieu dans les liquides biologiques (sang, sperme et sécrétions vaginales, lait, liquide broncho-alvéolaire...) et le cerveau.

Bien qu'indispensable à l'entrée virale, le CD4 n'est pas suffisant pour assurer l'entrée du virus dans la cellule. Des récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés aux protéines G (RCPG) appartenant à la famille des récepteurs aux chimiokines sont également nécessaires. Deux corécepteurs principaux ont été identifiés : CCR5<sup>23,24</sup> (*C-C chemokine receptor type 5*) et CXCR4<sup>25</sup> (*C- X-C chemokine receptor type 4*). L'utilisation de l'un ou de l'autre permet de définir le tropisme viral. Les clones viraux qui utilisent le CXCR4 comme corécepteur sont appelés « CXCR4-tropiques » ou X4 ou encore « lymphotropiques » car principalement exprimé à la surface des lymphocytes. Les clones R5 ou « CCR5-tropiques » ou encore « monocyto-tropiques » quant à eux reconnaissent préférentiellement le CCR5 qui est exprimé principalement à la surface des macrophages, monocytes et CD. Certaines souches sont capables d'utiliser les deux corécepteurs avec une efficacité comparable. Elles sont alors qualifiées de souches à « tropisme double » ou « CXCR4/CCR5-tropiques », qu'il faut distinguer du tropisme dit « mixte » des patients infectés par une population de virus à tropismes différents. De nombreuses études ont montré que le tropisme des populations virales évolue au cours de l'histoire naturelle de l'infection par le VIH-1 : les souches R5 sont transmises plus efficacement que les souches X4<sup>26</sup> et sont donc majoritaires au stade précoce de l'infection, tandis que les souches X4 ont tendance à dominer en phase plus tardive<sup>27</sup>. De façon intéressante, une mutation dans le gène CCR5<sup>28</sup> connue sous le nom de CCR5Δ32 conduit à l'arrêt prématuré de la synthèse du corécepteur, et donc, à l'état homozygote, confère une résistance à l'infection par le VIH-1. Cette mutation est



présente uniquement dans la population caucasienne, à une fréquence estimée de 1% (entre 10% et 18% à l'état hétérozygote).

Le virus va donc d'abord se fixer au récepteur CD4 via la gp 120 ce qui va induire des changements conformationnels de cette dernière qui va alors exposer ses sites de fixation aux corécepteurs CCR5 ou CXCR4. Le complexe formé entre la gp120, le CD4 et le corécepteur entraîne un nouveau réarrangement architectural qui libère la sous-unité gp41 conduisant à l'insertion de son peptide de fusion dans la membrane plasmique. Cela aboutit à la fusion des membranes virales et cellulaires et à la libération de la capsid virale dans le cytoplasme de la cellule cible.

Ensuite il va y avoir libération du génome viral par **décapsidation** et, de façon quasi simultanée, **rétrotranscription** de l'ARN viral en ADN proviral double brin par la RT. Ces étapes permettent la formation du Complexe de Pré-Intégration (CPI) qui contient l'ADN double brin viral, des protéines virales et des protéines cellulaires. Ce CPI va être activement transporté vers le noyau où il sera importé, via un transport actif par les pores nucléaires. L'ADN viral est alors pris en charge par l'INT et va être **intégré** de façon stable via la liaison des LTRs au génome cellulaire<sup>29</sup>. On sait que l'ADN viral s'intègre de préférence dans des zones transcriptionnellement actives mais sans préférence pour une région chromosomique précise<sup>30</sup>. En l'absence d'intégration, l'ADN proviral peut se retrouver dans la cellule sous forme linéaire (ADNL) rapidement dégradée ou sous forme circulaire (cercle à 1-LTR ou à 2-LTR). Le rôle exact de cet ADN viral non intégré demeure encore une énigme. Une fois le provirus intégré, il va pouvoir rester latent pendant une longue période et il constitue alors le réservoir viral. A tout moment, sous l'action activatrice de *tat*, il va pouvoir utiliser la machinerie cellulaire pour se répliquer : le génome rétroviral est alors transcrit comme n'importe quel gène cellulaire.

Le processus de **transcription** est scindé en deux étapes : une première étape qui permet la production d'une faible quantité d'ARN messagers (ARNm) viraux qui seront ensuite multi-épissés et exportés vers le cytoplasme pour former les protéines de régulation *tat*, *nef* et *rev*. La deuxième étape a lieu sous l'action activatrice de *tat* et va entraîner la production d'une grande quantité d'ARNm mono-épissés, qui donneront les protéines *env*, *vif*, *vpu* et *vpr* et, non épissés qui fourniront les précurseurs protéiques *gag* et *gag-pol*. Ces ARNm sont ensuite traduits en polyprotéines qui après **maturation** par la PR, donneront les protéines de structure, les protéines accessoires et les enzymes virales.

Le cycle de réplication du VIH-1 se termine par l'**assemblage** et le **bourgeoisement** de nouvelles particules virales à partir de la membrane plasmique. C'est un processus complexe qui a lieu sous la direction du précurseur *gag* p55 et qui nécessite l'intervention du complexe de protéines cellulaires *endosomal sorting complex required for transport* (ESCRT)<sup>31</sup>. Ce complexe est habituellement utilisé

par la cellule pour la formation de vésicules à l'intérieur des endosomes et pour la scission des membranes plasmiques au cours de la division cellulaire. Lors de l'infection par le VIH-1, il est redirigé par le virus au niveau du site d'assemblage des particules virales pour permettre le bourgeonnement des virions. De façon concomitante, les précurseurs *gag* et *gag-pol* sont clivés par la PR pour donner les protéines du virus qui constitueront les particules virales infectieuses.

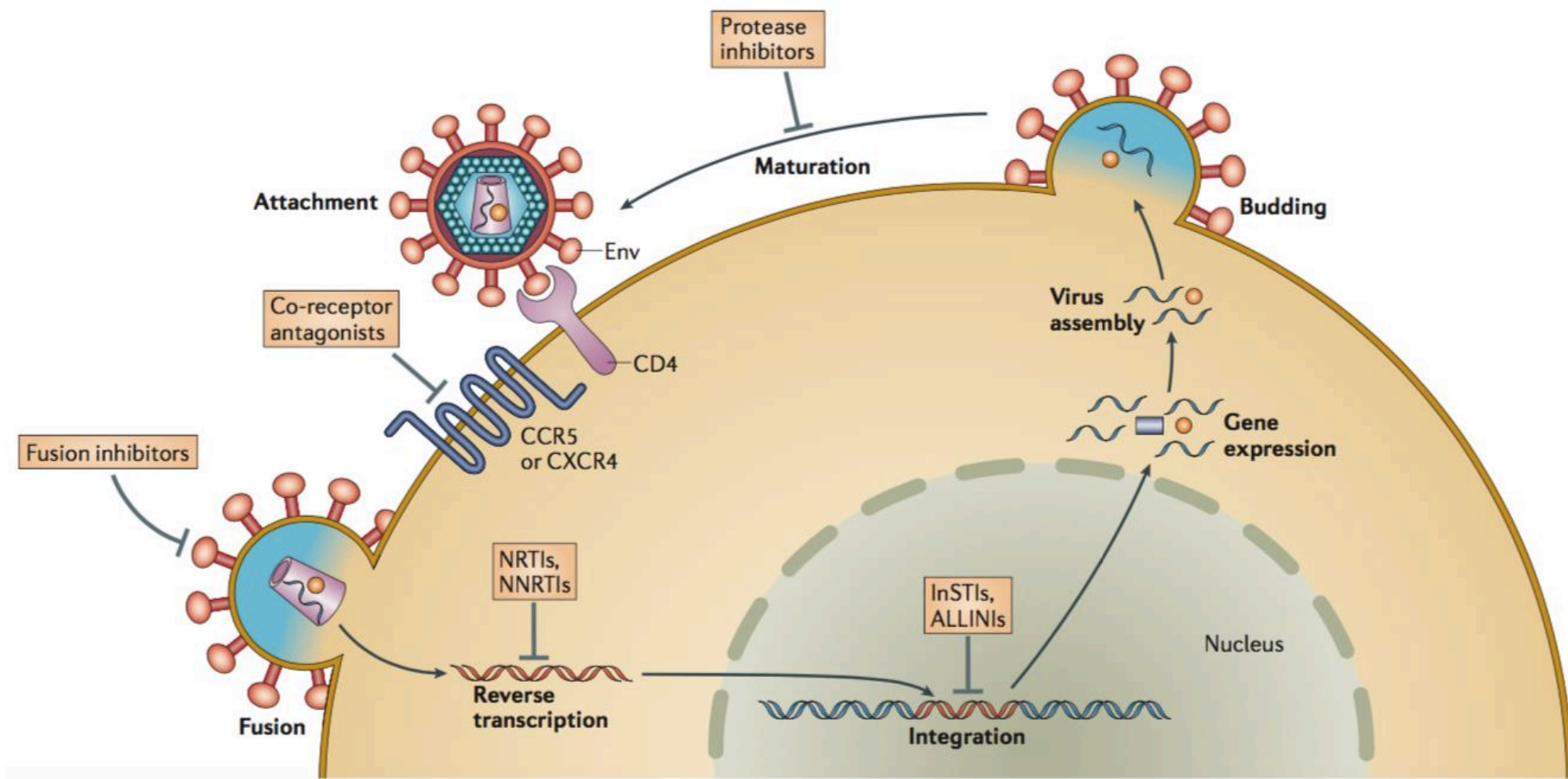


Figure 5 - Cycle de réplication du VIH-1  
 D'après Laskey et al. 2014<sup>32</sup>

#### 4. Physiopathologie de l'infection par le VIH-1

Le VIH-1 est majoritairement transmis par voie sexuelle via les voies génitales ou la muqueuse rectale. Il peut également être transmis par voie sanguine, notamment via les produits dérivés du sang et par échange de seringues contaminées, ou encore de façon verticale de la mère à l'enfant, au cours de la grossesse, l'accouchement ou lors de l'allaitement. Le risque de transmission est directement corrélé à la CV, d'où la nécessité d'obtenir l'indéteçtabilité chez les personnes vivant avec le VIH (PVIH) afin de réduire sa transmission.

En l'absence de prise d'un TAR, l'infection va évoluer en trois phases (**Figure 6**).

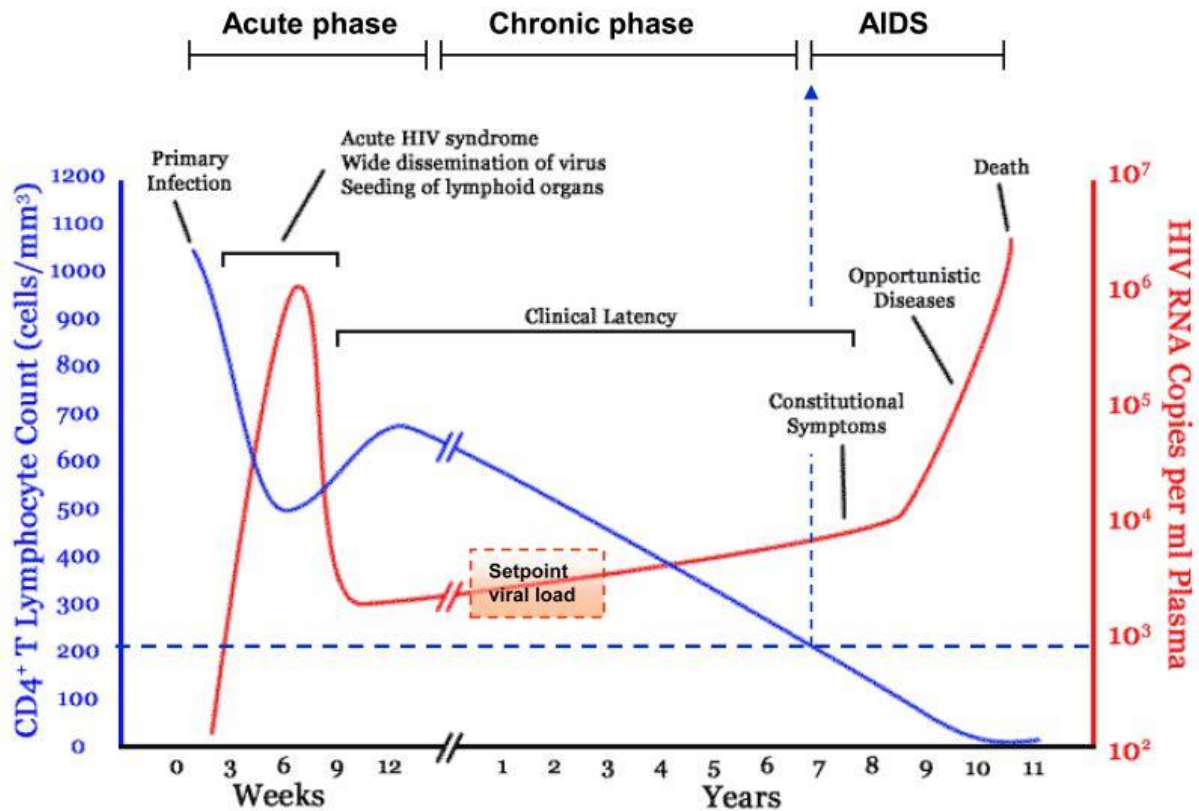


Figure 6 - Évolution naturelle de l'infection par le VIH-1

D'après An and Winkler 2010<sup>33</sup>

## 4.1 La primo-infection

C'est la phase qui survient juste après la contamination. Elle correspond à la dissémination du virus dans l'organisme. Elle s'accompagne dans 50 à 80% des cas d'un syndrome mononucléosique ou un syndrome pseudo-grippal. Il peut être aussi totalement asymptomatique. Sur le plan virologique, il va y avoir une réplication active du virus facilitée par l'absence de réactions immunes spécifiques, et la CV plasmatique va atteindre son maximum en quatre semaines environ. La réplication intense du virus va également permettre la constitution du réservoir viral dès les premiers jours de l'infection<sup>34</sup>. Sur le plan biologique, le pic virémique s'accompagne d'une déplétion rapide mais transitoire des lymphocytes T CD4+ puis de l'installation d'une réponse immunitaire cellulaire et humorale spécifique. Il va y avoir production d'anticorps neutralisants dirigés contre les protéines du virus, et production de lymphocytes T CD8+ cytotoxiques qu'on appellera CTL spécifiques du VIH-1. L'ensemble va conduire à une diminution de la CV plasmatique jusqu'à une valeur seuil nommée « *set point* », variable selon les individus.

## 4.2 La phase asymptomatique

Cette phase est également nommée phase de latence clinique du fait de son caractère asymptomatique. Sa durée peut varier de 2 à 15 ans en l'absence de TAR. Durant cette phase, on observe un équilibre entre le virus et le système immunitaire. La CV se stabilise : le système immunitaire, grâce au renouvellement constant du stock de lymphocytes T CD4+, contrôle la réplication virale sans pour autant pouvoir l'éradiquer. Le virus continue de se répliquer, ce qui provoque un état d'activation immunitaire chronique. Au cours des années, le système immunitaire finit par s'épuiser et les organes lymphoïdes n'arrivent plus à compenser la déplétion lymphocytaire. Le taux de lymphocytes CD4+ va alors lentement diminuer jusqu'à devenir inférieur à 200 cellules par millilitre, seuil généralement associé au développement des premières manifestations opportunistes.

## 4.3 Le stade SIDA

Le déclin du taux de lymphocytes CD4+ et de la réponse immunitaire va entraîner une ré-ascension de la CV. Le système immunitaire totalement affaibli n'est alors plus capable de protéger l'organisme, le rendant vulnérable à de multiples infections opportunistes (bactériennes, virales, fongiques et parasitaires) et au développement de cancers (lymphomes malins non Hodgkiniens, sarcomes de Kaposi). Cette phase va aboutir en quelques mois au décès.

#### 4.4 Cas particulier des patients « controllers »

La majorité des patients infectés par le VIH-1 va inévitablement, en l'absence de traitement, progresser vers le stade SIDA. Cependant, une minorité de patients (<1%) parviennent à contrôler spontanément la réplication virale en l'absence de traitement (**Figure 7**). En effet, ces patients appelés *controllers* parviennent naturellement à maintenir une CV faible (CV < 2000/mL) pour les patients « supprimeurs virémiques », voire même indétectable (CV < 50 copies/mL) pour les « elites controllers »<sup>35,36</sup>. Ces derniers garderont un taux élevé de lymphocytes T CD4+ et ne développeront pas (ou très peu) de maladie opportuniste. Les mécanismes précis mis en jeu pour contrôler l'infection ne sont toujours pas élucidés et restent un enjeu majeur de la recherche sur le VIH. Plusieurs études suggèrent que la réponse cellulaire T CD8+ jouerait un rôle majeur dans ce contrôle. En effet, il existe chez ces patients une surreprésentation de certains allèles du CMH de classe I tels que le HLA-B\*27 et le HLA-B\*57<sup>37,38</sup>. De plus, ce groupe de patients présenterait une réponse T CD8+ ou encore appelée réponse CTL plus forte que chez les non *controllers* : leurs CTL seraient doués d'une capacité de prolifération plus importante en réponse aux antigènes du VIH-1 et posséderaient une capacité de cytotoxicité supérieure<sup>39,40</sup>.

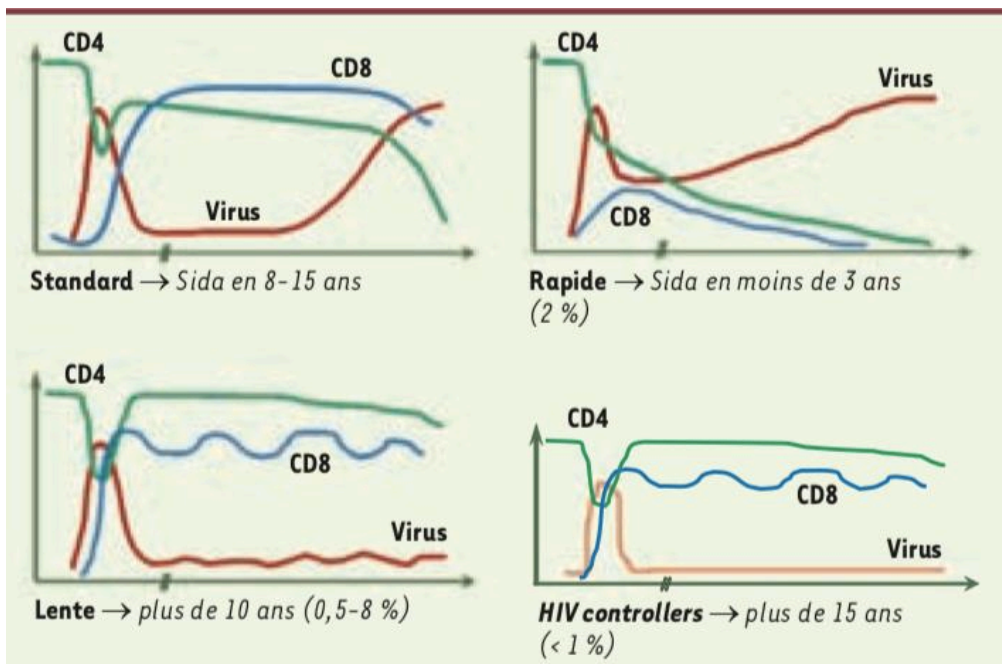


Figure 7 - Différents types d'évolution de la maladie VIH

D'après Martinez et al. 2008<sup>41</sup>

## 5. Le réservoir du VIH-1

### 5.1 Définition du réservoir viral

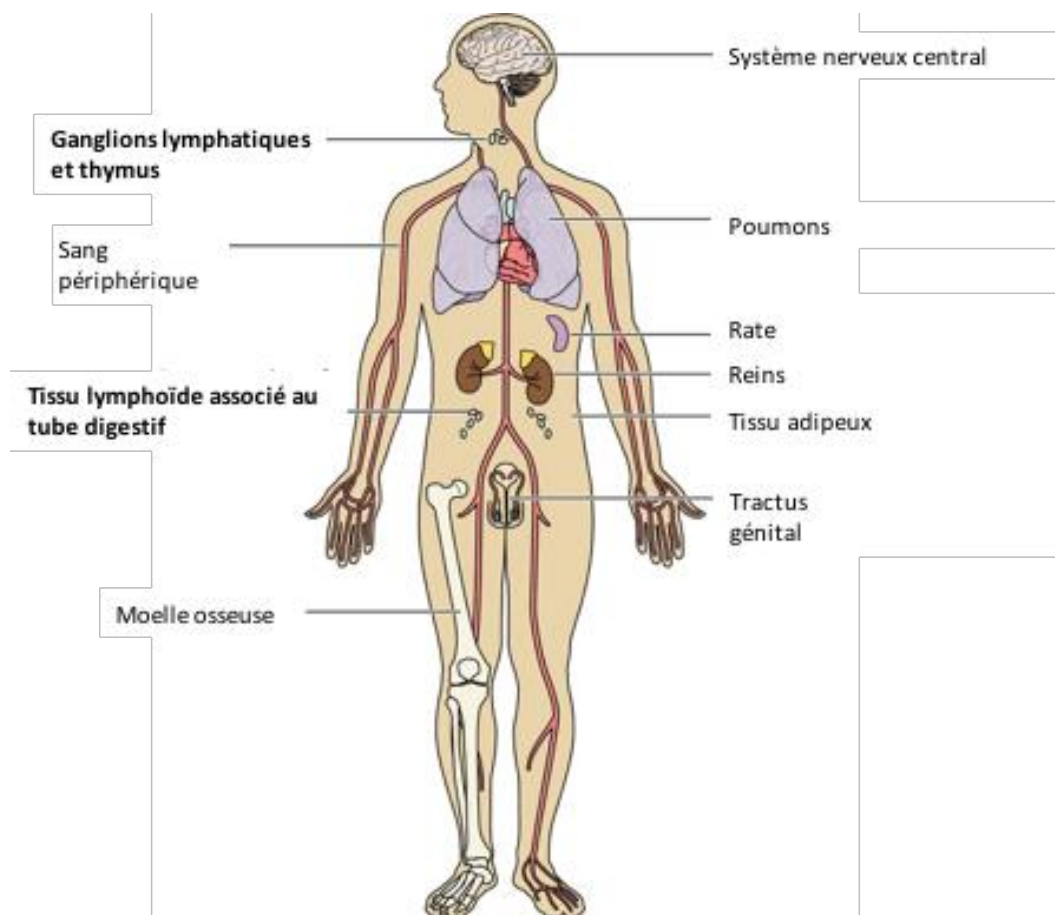
Bien que les TAR permettent aux patients adhérents de contrôler l'infection par le VIH-1 et d'obtenir une CV indétectable, l'interruption du traitement entraîne invariablement<sup>42</sup> et dans un délai plus ou moins long<sup>43</sup>, la réapparition d'une répllication virale détectable, car le VIH-1 persiste dans des réservoirs latents viraux. Ces réservoirs peuvent être définis comme un type de cellule ou un site anatomique où le virus persiste sous forme d'un provirus latent ne s'exprimant peu ou pas, lui permettant ainsi d'échapper au système immunitaire. Ils constituent donc un obstacle majeur à l'éradication virale.

La latence du VIH-1 correspond en fait à l'intégration dans le génome de la cellule hôte, de provirus latents intacts et transcriptionnellement silencieux mais ayant conservé leur capacité de répllication. Ces cellules ne produisent pas de particules virales à l'état de repos, mais sont capables de générer des nouveaux virions infectieux en réponse à leur activation par divers stimuli, et sont donc à l'origine du rebond viral observé à l'arrêt du TAR.

Cette latence s'établit très tôt dans l'histoire de l'infection naturelle par le VIH-1<sup>44</sup> : des études menées sur des primates non humains (NHP) suggèrent que le réservoir latent s'établit dans les 3 jours suivant l'infection, et qu'une détection et un traitement précoce seraient insuffisants pour prévenir l'établissement de la latence<sup>45</sup>. D'autres études réalisées chez l'homme ont confirmé que l'initiation rapide d'un TAR ne pouvait empêcher l'établissement du réservoir mais qu'elle pouvait en limiter sa taille<sup>46,47</sup>.

On distingue deux sources principales qui contribuent au réservoir viral<sup>48</sup> :

- **le réservoir cellulaire** représenté par des cellules quiescentes hébergeant la latence virale majoritairement représenté par les T CD4+ mémoires<sup>49</sup>.
- **les compartiments anatomiques**, également appelés « **sanctuaires** » peu ou pas accessibles au système immunitaire et aux TAR, qui comprennent notamment le système nerveux central (SNC), le tissu lymphoïde dont le GALT et le tractus génital (voir **Figure 8**). De plus la CV dès le début de la primo-infection est beaucoup plus importante dans le GALT que dans le compartiment sanguin par exemple.



**Figure 8 - Réservoirs anatomiques du VIH-1**

Adapté d'après Avettand-Fénoël et al<sup>50</sup>

Bien que, pour des raisons pratiques évidentes, la plupart des études sur les réservoirs du VIH se concentrent sur les lymphocytes T périphériques infectés latents, la majorité du réservoir est localisée dans les sanctuaires et particulièrement dans les tissus lymphoïdes. La distinction entre réservoir cellulaire et sanctuaires est importante, car les thérapies qui seraient efficaces contre un réservoir cellulaire latent pourraient ne pas l'être contre les virus produits par un compartiment donné et vice versa notamment en raison d'une mauvaise pénétration des drogues.

## **5.2 Mécanisme d'établissement de la latence**

Il existe deux types de latences appelées pré-intégratives ou transcriptionnelles, selon qu'elles aient lieu avant ou après intégration du génome viral dans le génome de son hôte<sup>51</sup>. La latence pré-intégrative survient suite à un blocage partiel ou complet du cycle viral avant l'intégration du virus dans le génome hôte par exemple à cause d'un défaut en dNTPs (DéoxyNucléotide Triphosphates) dans les cellules métaboliquement inactives. La latence post-intégrative ou transcriptionnelle survient elle, après



intégration dans le génome hôte et résulte d'une combinaison de mécanismes moléculaires qui vont conduire à la mise en pause de l'ARN polymérase II<sup>52</sup> :

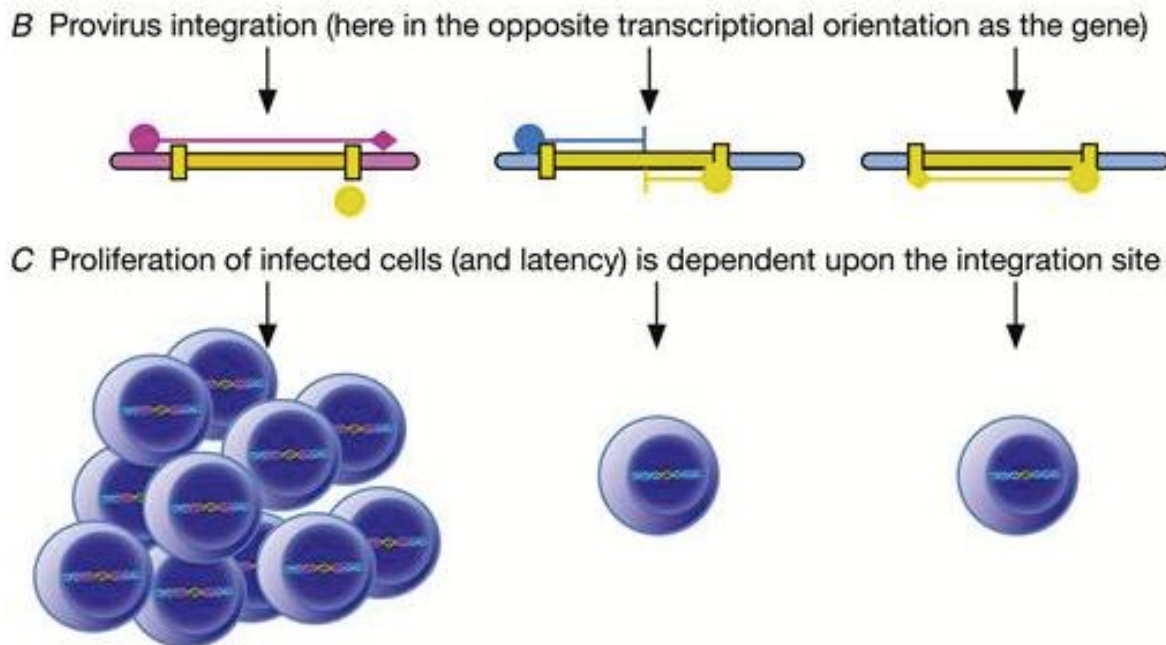
- i. modifications de l'organisation chromatinienne en nucléosomes à proximité des sites d'initiation de la transcription, ce qui empêche l'accès des facteurs de transcription au promoteur.
- ii. modifications épigénétiques de la structure de la chromatine via des modifications post-traductionnelles des molécules d'histones, notamment méthylations et déacétylation<sup>53</sup> réduisant l'accessibilité des facteurs de transcription et de l'ARN polymérase II.
- iii. répression de *tat* ce qui empêche son accumulation indispensable à l'activation de la transcription virale.
- iv. Défaut en facteurs de transcription : exemple : séquestration de NF-κB (nuclear factor kappa B) dans le cytoplasme.

### 5.3 Maintien du réservoir quiescent

Comme déjà évoqué, le principal obstacle à l'éradication complète du virus et donc à la guérison de l'infection par le VIH-1 est ce réservoir stable de provirus latent dans les cellules CD4+ au repos. Les mesures directes du réservoir latent chez les patients sous TAR ont montré un taux de décroissance très lent<sup>49</sup> ( $T_{1/2} = 3,7$  ans). Il faudrait alors 73 ans sous cART<sup>54</sup> pour éradiquer un réservoir constitué de  $10^6$  cellules, ce qui est complètement inenvisageable, si tant est que cela soit possible. La compréhension de la nature et des caractéristiques des réservoirs latents est donc la clé pour trouver un moyen de les purger et permettre la conception de nouvelles approches thérapeutiques visant à guérir du VIH-1. Pour cette raison, les réservoirs du VIH-1 sont actuellement au cœur des travaux de recherche scientifique.

Les mécanismes expliquant la stabilité du réservoir viral ne sont pas encore totalement élucidés. Une hypothèse, bien que controversée, serait la persistance d'une réplication à très faible niveau dans les sites sanctuaires réapprovisionnant périodiquement le réservoir latent, cependant la littérature reste très contradictoire sur ce sujet<sup>55,56</sup>. Un des arguments en faveur de cette hypothèse serait la faible pénétration des TAR qui ne permettrait pas d'atteindre des concentrations suffisantes pour contrôler la réplication. Mais ce mécanisme n'explique pas pourquoi il n'existe pas d'évolution des séquences virales dans le plasma ou les cellules même après des années sous TAR<sup>57</sup>. De même, elle ne permet pas d'expliquer pourquoi il n'y a pas d'apparition de mutation de résistance malgré un TAR efficace. Le réservoir latent pourrait également être maintenu grâce à la longévité et la prolifération homéostatique des lymphocytes T mémoire infectés. Enfin, selon une hypothèse plus récente, le maintien du réservoir clonal pourrait être dû à l'expansion clonale du réservoir cellulaire latent<sup>58-61</sup>.

Bien que les mécanismes ne soient pas clairs, il semblerait que l'intégration dans certains gènes favoriserait la persistance et la prolifération cellulaire<sup>62</sup> et engendrerait une expansion clonale des cellules infectées (**Figure 9**). Ainsi, le maintien des génomes infectieux se ferait par expansion clonale des lymphocytes T CD4+ ce qui expliquerait la faible variabilité virale observée à l'interruption du TAR.



**Figure 9 - Expansion clonale du VIH-1 à partir de sites d'intégration identiques**  
**D'après Mullins et al. 2017<sup>62</sup>**

Par ailleurs, la présence de provirus « défectifs » incomplets chez les patients infectés par le VIH-1 a été bien documentée ces dernières années. Ils représenteraient plus de 90% des provirus dans le sang périphérique<sup>63</sup> et seraient le résultat d'altérations génétiques létales comme par exemple des hypermutations G vers A induites par l'Apolipoprotéine B Editing Complex 3G (APOBEC3G). Leur rôle dans le maintien du réservoir quiescent est encore controversé : le consensus actuel tend à dire que ces derniers sont des produits sans issue incapables de se répliquer qui représentent donc collectivement un « cimetière » de virus. D'autres auteurs proposent que ces provirus ne sont pas défectifs au sens strict du terme, mais qu'ils représenteraient plutôt des formes incomplètes de provirus capables d'exprimer certaines protéines comme *gag*, *pol*, et *nef* mais sans exprimer de virus infectieux<sup>64</sup>. Se pose alors la question de l'intérêt de leur élimination dans les stratégies d'éradication du VIH-1.

## 6. « HIV cure » : comment peut-on espérer se débarrasser du VIH ?

Les TAR mis sur le marché ces dernières années ont permis une augmentation significative de l'espérance de vie des PvVIH, en réduisant significativement la morbidité et la mortalité associées à l'infection par le VIH. Cependant, leurs objectifs à l'heure actuelle sont l'obtention et le maintien d'une CV plasmatique < 50 copies/ml sans permettre une guérison. De plus tous les TAR (à l'exception de Enfuvirtide) relèvent d'une administration par voie orale et nécessitent une observance rigoureuse sous peine de favoriser l'apparition de souches virales résistantes, exposant à un risque d'échec thérapeutique. L'instauration de la prescription de TAR à visée prophylactique (Prophylaxie pré-exposition PrEP) se heurte au même problème : des études confirment que les échecs observés par insuffisance de protection sont à rattacher en grande partie à un déficit d'observance<sup>65</sup>. Ces difficultés ont conduit au développement de formulations de TAR à longue durée d'action (TAR-LA)<sup>66</sup> permettant une injection par mois, voire tous les deux mois. Les TAR-LA sont non seulement destinés à remplacer la prise quotidienne de comprimés (et donc améliorer l'observance), mais aussi à réduire la variabilité de la pharmacocinétique des TAR, tout en minimisant leur toxicité et en améliorant leur biodistribution. A l'heure actuelle, deux nouvelles formulations sont en cours d'évaluation de phase III chez l'homme sous la forme de nanosuspensions injectables : un inhibiteur d'intégrase, le cabotégravir et un inhibiteur non nucléosidique de la transcriptase inverse, la rilpivirine. Cependant malgré leurs avantages incontestables, ces nouvelles formulations galéniques ne permettront pas d'obtenir la guérison.

On distingue aujourd'hui la guérison "fonctionnelle" de la guérison « virologique ». La guérison « fonctionnelle », ou rémission, correspond à un état de contrôle stable et durable de l'infection, qui permettrait de vivre sans traitement et sans symptôme de la maladie malgré la persistance d'infimes traces de virus. La guérison "virologique" est caractérisée par l'éradication complète du virus de l'organisme. Deux objectifs donc, mais avec une ambition différente (**Tableau 3**).

**Tableau 3 - Deux types de guérison du VIH-1 : guérison virologique et fonctionnelle**

Guérison "virologique"	Guérison "fonctionnelle"
Eradication	Contrôle
Elimination de toutes les cellules infectées	Contrôle de l'infection à long terme sans TAR
ARN <1 cp/ml	ARN <50 cp/ml
Ex : allogreffe de moelle (patient de Berlin)	Ex : <i>controllers</i>

Ainsi, la recherche s'articule sur deux tableaux. Dans un futur proche, une guérison "virologique" pourrait représenter un objectif intermédiaire raisonnable. L'étude des patients *controllers* qui sont capables de contrôler la réplication en l'absence de TAR, a montré que ce degré de contrôle nécessite à la fois une puissante réponse immunitaire spécifique du VIH-1 et une faible taille du réservoir. Le premier peut être atteint avec des vaccins thérapeutiques ou autres immunothérapies. Tandis qu'une limitation de la taille du réservoir peut être obtenue grâce à une initiation précoce du TAR ou via des stratégies de type « Shock and Kill ».

## **6.1 La guérison "virologique"**

### **6.1.1 La greffe de moelle osseuse**

C'est, à ce jour, la stratégie qui a permis l'unique cas de guérison au monde du VIH-1. Il s'agit de l'américain Timothy Brown, également connu comme « the Berlin patient »<sup>67</sup>. Diagnostiqué séropositif en 1995, il développe en 2007 une leucémie aiguë lymphoïde (LAL) nécessitant une greffe de cellules souches hématopoïétiques (CSH). Son hématologue a la bonne idée d'identifier un donneur HLA-identique homozygote pour l'allèle CCR5 $\Delta$ 32, empêchant l'expression du CCR5 à la surface des cellules et rendant celles-ci résistantes au VIH-1, du moins aux souches de tropisme R5. Alors que le TAR avait été arrêté pour la réalisation de la greffe, la CV du patient est demeurée indétectable, même sans la reprise du TAR. L'ADN proviral est quant à lui devenu indétectable 62 jours post-greffe, lorsque le chimérisme complet a été atteint. En 2011, le patient de Berlin est officiellement déclaré guéri de l'infection à VIH-1<sup>68</sup> et aujourd'hui, plus de dix après la greffe, aucune trace du virus n'a pu être mise en évidence avec les technologies actuellement disponibles. Ce premier cas de guérison a engendré un élan d'espoir incommensurable pour la communauté scientifique. Cependant le succès de cette stratégie est limité par un risque de complications élevé et une disponibilité limitée des donneurs HLA compatible porteurs de la mutation (1% de la population caucasienne), ainsi que par le risque de sélection de souches X4 ou de souches à tropisme double. A ce jour, 6 autres cas de greffes de CSH avec des donneurs CCR5 $\Delta$ 32 homozygotes ont été rapportés dans la littérature, tous soldés par un échec.

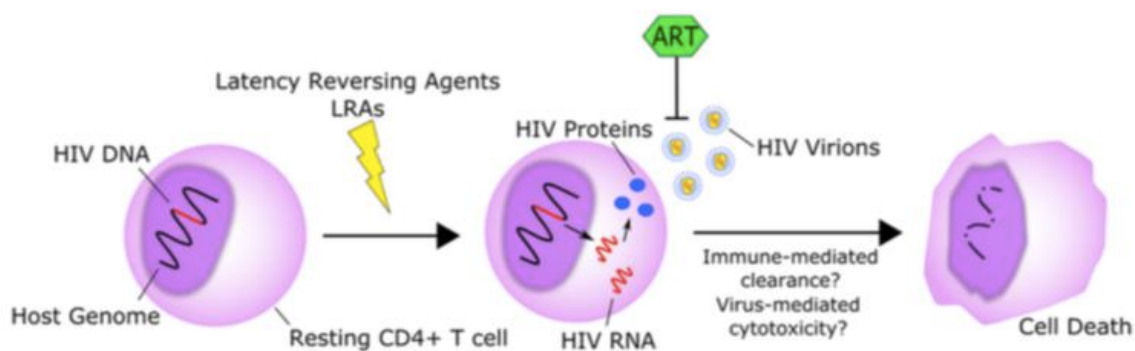
### **6.1.2 La thérapie génique**

Le cas du patient de Berlin a ouvert une fenêtre sur un espoir de guérison et sur le potentiel de la thérapie génique cellulaire pour contrôler l'infection par le VIH-1. Depuis quelques années, les chercheurs se sont donc penchés sur la mise au point d'outils d'ingénierie génomique visant à inactiver ou supprimer un gène voire de le remplacer par un autre. Technologies

particulièrement intéressantes pour reproduire la mutation CCR5 $\Delta$ 32 ou encore cibler directement le provirus dans les cellules latentes<sup>69,70</sup>. Parmi ces outils on retrouve les technologies ZFN (*Zinc Finger Nucleases*) et TALEN (*Transcription Activator-like Effector Nuclease*) qui font intervenir une nucléase reconnaissant l'ADN à couper. Plus récemment, la révolution CRISPR/Cas9 (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*) plus précise, plus rapide et surtout moins chère, est capable d'identifier directement l'ADN grâce à un ARN guide. Des essais ciblant CCR5 et/ou CXCR4<sup>71-74</sup> réalisés dans des cellules primaires, chez l'animal et même chez l'homme, ont d'ores et déjà montré des résultats encourageants, notamment concernant la CV et le taux de lymphocytes T CD4+. D'autres travaux utilisant les mêmes outils ont tenté d'éradiquer l'ADN proviral des réservoirs en utilisant des séquences cibles spécifiques du VIH-1<sup>75-77</sup> ou, plus récemment, de certaines régions très conservées dans les LTR du VIH-1<sup>78</sup>. Ces études ont révélé que, de manière générale, les techniques d'édition génique peuvent prévenir en partie la réplication du virus dans les cellules T CD4+ sans pouvoir totalement l'éliminer. En effet, il semblerait que le VIH-1 serait capable de rapidement échapper aux techniques d'éditions géniques en adaptant son génome pour échapper aux attaques<sup>79</sup>.

### 6.1.3 Réversion de la latence virale : « Shock and Kill »

Le principe de cette stratégie consiste à purger les provirus intégrés dans les cellules latentes constituant les réservoirs du VIH-1. Cette stratégie s'articule en deux étapes (**Figure 10**).



**Figure 10 - Principe de la stratégie « Shock and Kill »**

D'après Kim et al.<sup>80</sup>

La première étape consiste à réactiver le virus en utilisant des « agents réverseurs de latence » (LRA pour *Latency-Reversing Agents*) qui permettent d'inverser la latence et de « réveiller » le virus<sup>69,80</sup>. Une fois le virus transcriptionnellement actif, il devient accessible aux TAR et peut être reconnu et détruit par le système immunitaire.

- Shock : réactivation pharmacologique du VIH latent

Divers LRA sont capables d'inverser le mécanisme de latence du VIH-1 : ils peuvent agir sur différentes voies, entraînant ainsi une augmentation de la transcription du VIH et/ou de la production de virions (**Tableau 4**). Ainsi de nombreuses molécules, majoritairement des anti-cancéreux, sont ou ont été testées dans des essais thérapeutiques chez des PvVIH. C'est par exemple le cas du vorinostat<sup>81</sup> et de la romidepsin<sup>82</sup>, puissants inhibiteurs des histones déacétylases (HDACi), une enzyme qui intervient dans le maintien de la latence du virus. Le disulfiram, un médicament utilisé depuis plus de soixante ans pour lutter contre la dépendance alcoolique a également montré sa capacité à activer la transcription du VIH-1 dans les cellules latentes en interagissant avec la voie PI3K/Akt<sup>83</sup>.

- Kill : destruction des cellules infectées

D'après les premières données, les LRA semblent représenter une piste prometteuse vers la guérison, mais il apparaît qu'une intervention supplémentaire pour détruire ces cellules infectées soit nécessaire. En effet, globalement ils permettent d'activer efficacement la transcription virale et d'augmenter significativement l'ARN viral dans les cellules T CD4+ voire même dans certains cas l'ARN plasmatique, mais ils ne suffisent pas pour diminuer significativement la taille du réservoir du VIH-1<sup>84</sup>. Là aussi, de nouvelles approches intervenant notamment au niveau des protéines du VIH-1 qui interagissent avec les voies de signalisation intracellulaires conduisant à la mort cellulaire sont à l'essai. Par exemple, des travaux sont actuellement en cours pour tester l'efficacité du venetoclax, un antagoniste du facteur anti-apoptotique cellulaire BCL2 (*B-cell lymphoma 2*). En effet, des études préliminaires ont montré que son expression était augmentée dans les cellules infectées par le VIH-1 dans le but de prévenir l'apoptose induite par la PR virale<sup>85</sup>.

## 6.2 La guérison "fonctionnelle"

### 6.2.1 Initiation d'un TAR la plus précoce possible

En septembre 2015, l'OMS annonce que « toute personne infectée par le VIH devrait commencer le traitement antirétroviral le plus tôt possible après le diagnostic ». En effet, de nombreuses études évaluant les effets à long-terme de la mise en route d'un TAR immédiate *versus* différée<sup>86,87</sup> ont clairement démontré le bénéfice de l'instauration rapide d'un TAR. Elle permet non seulement une baisse de la morbi-mortalité avec notamment une diminution majeure du risque de survenue d'évènement grave ou de décès, mais aussi une meilleure préservation du système immunitaire, avec notamment le maintien ou une restauration d'un nombre de CD4 > 500/mm<sup>3</sup>. Une initiation précoce constitue également un moyen performant de réduction du risque de transmission du VIH-1. D'un

point de vue virologique, l'instauration précoce d'un TAR permet de diminuer la taille du réservoir<sup>88,89</sup>, paramètre prédictif du délai avant le rebond viral observé à l'arrêt du TAR. Cependant, le délai d'instauration du TAR permettant d'impacter l'établissement du réservoir viral n'est pas clairement établi. En effet, il existe très peu d'études à ce sujet, du fait de la difficulté d'un suivi de patients à un stade très précoce de l'infection. Il semblerait qu'il y aurait une décroissance de l'ADN viral intégré d'autant plus importante que le traitement est débuté précocement<sup>90</sup>. Ces observations sont particulièrement intéressantes pour les nouveau-nés de mères infectées.

## 6.2.2 La stratégie « Block and Lock »

Récemment, une nouvelle approche a été proposée. C'est la stratégie « Block and Lock », qui, à l'inverse de la stratégie « Shock and Kill », consiste à piéger le virus dans la cellule hôte en induisant une latence irréversible (**Figure 11**). Des résultats prometteurs ont d'ores et déjà été obtenus avec le didehydro-Cortistatin A (dCA), un inhibiteur de la protéine *tat*<sup>91</sup>. Dans la cellule hôte, la protéine *tat* virale se lie à l'ARNm du VIH-1 et recrute efficacement les facteurs transcriptionnels nécessaires au promoteur du VIH pour initier la transcription virale. Elle est donc indispensable à la réplication du virus. En bloquant cette protéine, l'équipe du Pr Susana Valente a montré que l'ajout de dCA à des souris sous TAR efficace, permettait de retarder et de réduire significativement les niveaux de rebonds viraux lors de l'interruption du traitement<sup>92</sup>.

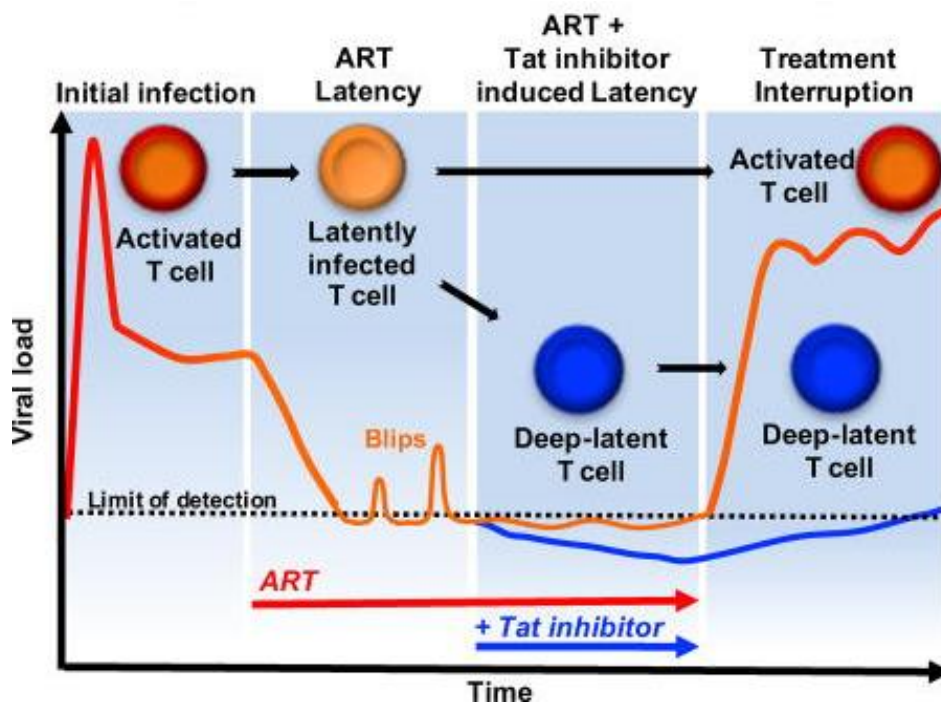


Figure 11 - Principe de la stratégie « Block and Lock »

D'après Kessing et al.<sup>92</sup>

Une autre façon de définitivement réduire au silence le virus est d'utiliser des petits ARN interférents (siRNA pour « *small interfering RNA* ») ou des ARN dits « en épingle à cheveux » (shARN pour « *short hairpin RNA* ») qui vont permettre d'inhiber l'expression de certains gènes du VIH-1 indispensables à sa réplication. Ces approches sont pour l'instant encore qu'à l'état de recherche.

### 6.2.3 L'immunothérapie

Ces dernières années, l'immunologie a révolutionné les options thérapeutiques en oncologie, en neurologie et dans de nombreuses autres pathologies infectieuses. Elle a pour but de contrôler l'inflammation, prévenir l'activation immunitaire ou encore promouvoir les réponses immunitaires efficaces. Dans la lutte contre le VIH-1, l'immunothérapie a également fait son apparition depuis de nombreuses années. Des approches diverses et variées sont ou ont été étudiées.

Une première approche consiste à induire la réponse immunitaire antivirale non spécifique. Elle peut se faire via l'administration de cytokines : par exemple l'interleukine 12 (IL-12) va induire la production d'interféron de type II (IFN- $\gamma$ ) par les lymphocytes T et les cellules Natural Killer (NK) et augmenter leur capacité cytotoxique. L'administration d'IL-2 permet elle, d'augmenter le taux de lymphocytes T CD4+ circulants et l'activité cytolytique des lymphocytes T CD8+<sup>93</sup>. Les effets de l'IL-7, l'IL-15 et l'IL-21 ont également été étudiés. Une autre stratégie consiste à utiliser des anticorps monoclonaux dirigés contre les protéines PD-1 et son ligand PD L-1 ou CTL-4 (pour « *Programmed Cell Death 1* » et « Cytolytic T-Lymphocyte Antigen 4 » respectivement). Ces anticorps, appelés « anticorps inhibiteurs des checkpoints immunitaires », vont permettre de lever le blocage de la réponse immunitaire observé au cours de l'infection par le VIH-1 et ainsi permettre la destruction des cellules infectées par le système immunitaire<sup>93</sup>.

Une autre approche vise à stimuler la réponse spécifiquement dirigée contre le VIH-1. Pour y parvenir, plusieurs options sont envisageables. Il est possible d'agir au niveau de la réponse cellulaire T : c'est une des bases de la vaccination thérapeutique qui sera développée dans un chapitre à part (voir paragraphe 0). Une autre option, très prometteuse, est le développement d'une nouvelle génération d'anticorps nommés bNAbs pour « broadly neutralizing antibodies ». Ces anticorps sont développés uniquement par une faible proportion de patients (appelés « neutralisateurs élités ») et apparaissent en général plusieurs années après le début de l'infection. A l'inverse des anticorps retrouvés chez la plupart des PvVIH, ils possèdent un puissant pouvoir neutralisant actif sur une grande variabilité de souches de VIH-1. Les avancées technologiques de ces dernières années ont permis de produire synthétiquement ces anticorps afin de les utiliser pour contrôler la CV et la progression de la maladie<sup>94</sup>.



## 6.2.4 Vaccination thérapeutique

Le principe de la vaccination thérapeutique est de renforcer la réponse immunitaire spécifiquement dirigée contre le VIH-1 chez des patients déjà infectés dans le but d'obtenir un meilleur contrôle de l'infection. C'est une forme d'immunothérapie active qui est déjà largement utilisée en cancérologie.

Le concept d'immunisation thérapeutique comme traitement du VIH a été proposé pour la première fois par Jonas Salk peu après la découverte du virus<sup>95,96</sup>, mais sans succès. Ce dernier a suggéré que la longue période séparant la primo-infection du stade sida était due à une réponse immunitaire spécifique qui, si elle était renforcée permettrait de ralentir la progression de la maladie. Depuis, de nombreuses constructions vaccinales ont été testées mais les résultats obtenus ne sont pas à la hauteur des espérances placées dans cette stratégie. En effet, jusqu'ici, aucun vaccin thérapeutique n'a eu la capacité de limiter le rebond viral à l'arrêt du TAR.

Il existe deux stratégies principales d'élaboration d'un vaccin thérapeutique. D'une part les vaccins inducteurs d'anticorps neutralisants : on sait que la région *env* qui code la gp41 et la gp120 contient des épitopes majeurs cibles des anticorps neutralisants. Cependant ces épitopes sont très peu immunogènes car, en plus d'être masqués ils sont d'une variabilité extrême, rendant complexe l'élaboration d'anticorps neutralisants actifs sur les isolats primaires du VIH<sup>97</sup>. D'autre part, les vaccins inducteurs de réponses d'immunité cellulaire qui vont permettre de stimuler la réponse CTL. C'est une stratégie particulièrement intéressante puisque les CTL représentent un des principaux effecteurs de la lutte antivirale. Comme déjà évoqué, l'importance de la réponse CTL dans l'infection par le VIH-1 a été démontrée grâce à l'étude des patients *controllers* et des patients en primo-infection<sup>98,99</sup>. Des résultats prometteurs ont par ailleurs été obtenus dans un modèle de NHP où les cellules T CD8 + induites par le vaccin contrôlaient la répllication du VIS<sup>100</sup>. Sur ces observations, et du fait de la complexité de la mise au point d'anticorps neutralisants, de nombreux vaccins visant à induire une réponse immunitaire spécifique et efficace sont en cours de développement, et la plupart d'entre eux sont destinés à promouvoir la réponse CTL. C'est par exemple le cas du vaccin HIV Lipo 5 développé par l'Agence Nationale de Recherche sur le Sida et les hépatites virales (ANRS). Ce vaccin lipopeptidique est constitué de 5 peptides, tous identifiés à partir de la souche de référence du VIH-1 HxB2 (*gag*(17-35), *gag* (253-284), *nef*(66-97), *nef*(116-45), *pol*(325-355))<sup>101-103</sup>. Chaque peptide est couplé à un groupement palmitoyl-lysylamide qui permet de faciliter l'entrée dans les CD présentant l'antigène et qui améliore l'immunogénicité du vaccin. Sa capacité à induire une réponse cellulaire spécifique a été étudiée dans divers essais cliniques chez les NHP<sup>104</sup> et chez des volontaires sains<sup>105</sup>. Les résultats obtenus sont pour l'instant assez mitigés.

Pour conclure, de nombreuses stratégies thérapeutiques sont actuellement à l'étude. Mais bien que certaines d'entre elles soient prometteuses, l'espoir de guérison du VIH-1 semble encore loin. On peut imaginer que de la même façon qu'une trithérapie antirétrovirale a été nécessaire pour contrôler la réplication du virus, il faudra moduler différentes approches pour enfin arriver à un contrôle définitif du réservoir.

**Tableau 4 - Résumé des nouvelles stratégies thérapeutiques du VIH-1**

	Mode d'action		Avantages/Inconvénients
Guérison "virologique"	Greffe de moelle osseuse	– Greffe de CSH avec des donneurs CCR5Δ32 homozygotes	Unique cas de guérison chez le "patient de Berlin" mais rebond viral dans les autres tentatives Faible prévalence du phénotype CCR5Δ32 dans une population HLA compatible Effets indésirables sévères voir fatals du conditionnement
	Thérapie génique	– Ciblant les récepteurs ou corécepteurs du VIH-1 (ZFNS, TALENS ou CRISPR/Cas9) – Ciblant le génome du VIH-1 (ZFNS, TALENS ou CRISPR/Cas9)	Risque d'un changement de tropisme de CCR5 to CXCR4 ou inversement Problème éthique de l'édition génique Développement de souches résistantes Problème éthique de l'édition génique
	Agents réverseurs de latence (LRA)	– Inhibiteurs des histones déacétylases (HDACi) (acide valproïque, vorinostat, panobinostat, romidepsin)	Active la transcription du VIH-1/Action sur la taille du réservoir latent controversé Faible efficacité et peu spécifique (acide valproïque)
		– Activateurs de NF-κB (prostatin, bryostatine)	Réactivation de l'expression des gènes du VIH-1 Pourrait moduler l'expression des récepteurs et co-récepteurs CD4, CXCR4 et CCR5 (prostatin)
		– Autres molécules • Inhibiteurs du bromodomaine (BET) • Agonistes des TLR • Inhibiteurs de l'ADN méthyltransférase, • Disulfiram	→ Réactivation de l'expression des gènes du VIH-1 Action spécifique au niveau de la transactivation de <i>tat</i> Induit la réponse immunitaire antivirale Action synergique avec les HDACi Action spécifique sur la voie PI3K/Akt80
Agent du "Kill"	– Interaction avec les voies de signalisation conduisant à la mort cellulaire (antagoniste BCL2..)	Apoptose des cellules infectées, action sur la taille du réservoir	
Guérison "fonctionnelle"	Antirétroviraux	– Initiation précoce	Préservation du système immunitaire /Limitation de la taille du réservoir Difficulté à mettre en œuvre
	Agents inducteurs de latence	– Inhibiteurs de <i>tat</i> (didehydro-Cortistatin A (dCA))	Inactivation de la transcription virale Retarde et réduit significativement les niveaux de rebonds viraux lors de l'interruption du traitement
		– Modulateurs de l'expression des gènes du VIH-1 (siRNA, shRNA)	Inhibition de l'expression des gènes du VIH-1 Problème éthique de l'édition génique
	Immunothérapie	– Cytokines et chémokines (IL-2, IL-7, IL-12, IL-21)	Amélioration non spécifique des réponses immunitaires antivirales (augmentation du taux de CD4+, améliore les capacités cytotoxiques des CTL...)
		– Immunomodulateurs (anti-CTLA-4, anti-PD-1)	Réactivation de l'expression des gènes du VIH-1/ Booste la clairance du virus par les cellules I Effets indésirables sévères
		– Anticorps neutralisants (broadly neutralizing antibodies : bNAbs)	Action neutralisante anti-VIH-1 / Action sur le rebond viral lors de l'interruption du traitement Coût et complexité de fabrication
		– Vaccins thérapeutiques : • Vaccins inducteurs d'anticorps neutralisants • Vaccins stimulants la réponse CTL	Action neutralisante anti-VIH-1 / Pourrait prévenir une nouvelle infection Faible efficacité / Hypervariabilité des épitopes de neutralisation Booste la réponse CTL / Action possible sur le réservoir Échappement immunitaire possible

## 7. La réponse CTL HLA-classe I restreinte au cours de l'infection par le VIH-1

### 7.1 Importance des CTL au cours de l'infection par le VIH-1

Les CTL constituent l'une des défenses principales de l'hôte contre les infections virales. De nombreux travaux ont montré qu'ils avaient un rôle majeur dans le contrôle de l'infection par le VIH-1 et qu'ils influençaient le cours du développement de la maladie. Leur présence semble même capitale puisque que l'administration d'anticorps monoclonaux anti-CD8 chez le modèle macaque infecté par le SIV est immédiatement suivie d'un rebond de la réplication virale. Réplication virale qui est à nouveau contrôlée avec la réapparition des cellules T CD8+<sup>106</sup>.

Leur rôle dans l'évolution de la maladie a été largement appréhendé grâce à plusieurs études de cohortes. Les premiers CTL spécifiques du virus apparaissent en phase aiguë de l'infection (**Figure 12**) et seraient responsables de la diminution de la CV jusqu'au set-point virologique<sup>107</sup>. S'installe ensuite un équilibre fragile entre la réponse immunitaire et la réplication virale caractérisant la phase chronique. Des réponses CTL spécifiques du VIH-1 sont en effet retrouvées chez la majorité des patients asymptomatiques, mais à des intensités inférieures à celles de la primo-infection. Elles peuvent être dirigées contre tous les antigènes viraux mais elles concernent majoritairement *gag* ainsi que *pol* et *nef*<sup>108</sup>.

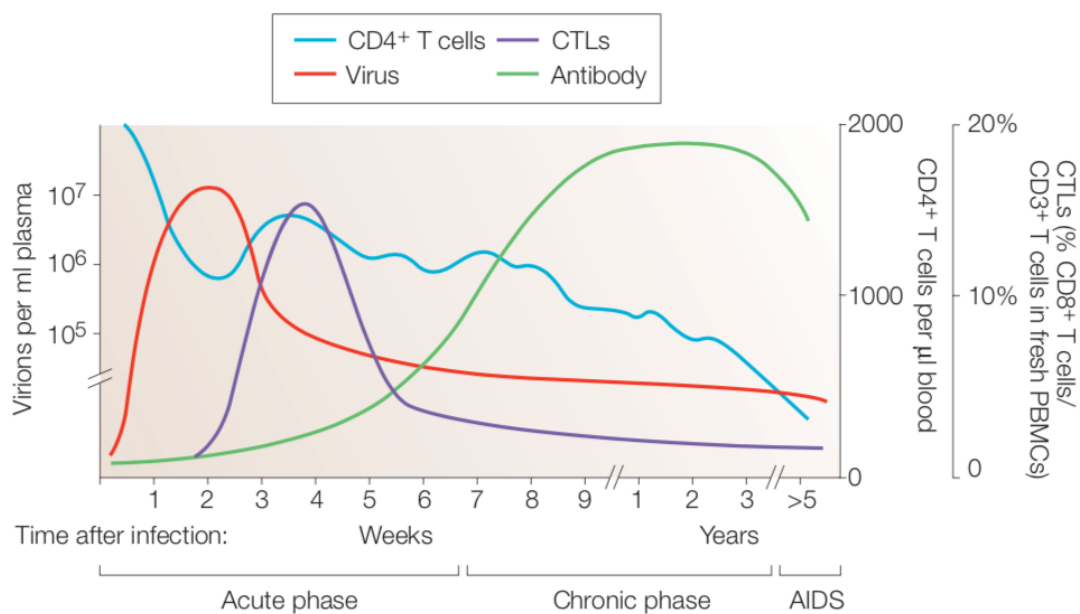
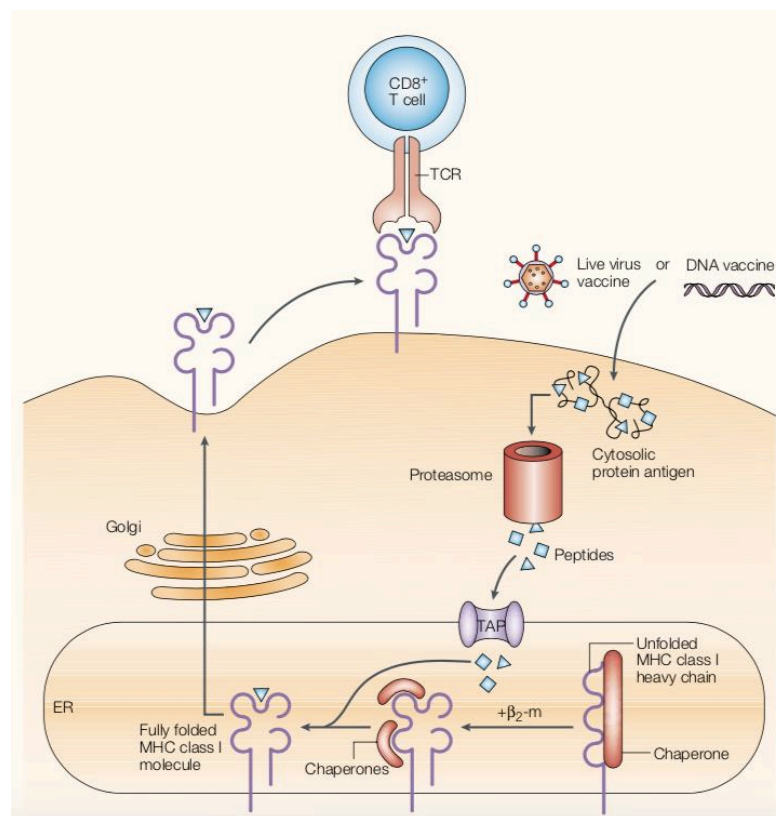


Figure 12 - Réponses immunitaires à médiation humorale et cellulaire lors de l'infection par le VIH-1 d'après Goulder et al. 2004<sup>109</sup>

## 7.2 Bases moléculaires de la réponse CTL : HLA et épitopes

La réponse CTL est déclenchée par la reconnaissance d'épitopes par le TCR (*T Cell Receptor*) présents à la surface des lymphocytes CD8+. Ces épitopes correspondent à des peptides antigéniques dérivés de protéines (par exemple virales) qui vont être dégradées en petits peptides par les protéasomes qui sont ensuite transloqués dans le réticulum endoplasmique par des transporteurs TAP (*Transporter Associated Antigen Protein*). Afin d'être reconnus, ils doivent être présentés à la surface des cellules hôtes infectées, par l'intermédiaire des molécules du CMH de classe I (**Figure 13**).

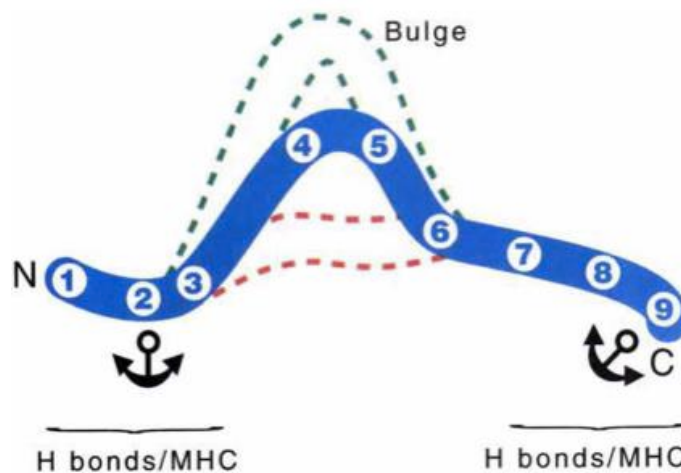


**Figure 13 - Présentation des antigènes par le CMH de classe I**

D'après McMichael et al. 2002<sup>110</sup>

Nommé HLA (Human Leukocyte Antigen) chez l'homme, le CMH correspond à un ensemble de gènes, situés sur le bras court du chromosome 6, impliqués dans la réponse immunitaire et dans la reconnaissance du « soi » et du « non soi ». On distingue les gènes HLA de classe I (HLA-A, HLA-B, HLA C) codant pour les molécules de CMH de classe I exprimées à la surface de l'ensemble des cellules nucléées et les gènes HLA de classe II (HLA DR, HLA DQ, HLA DP) dont l'expression est restreinte aux cellules présentatrices d'antigènes. Ces gènes présentent la particularité d'être tous polyalléliques et surtout extrêmement polymorphes (5 091 haplotypes identifiés pour HLA-B). Les molécules du CMH-I sont composées d'une chaîne lourde  $\alpha$  très polymorphique et une chaîne légère  $\beta$  invariable : la  $\beta$ 2-

microglobuline ( $\beta_2m$ ). La chaîne  $\alpha$  est organisée en 3 domaines extracellulaires,  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  et  $\alpha_3$ , une partie transmembranaire et une courte queue intra-cytoplasmique. Les domaines  $\alpha_1$  et  $\alpha_2$  délimitent une cavité dans laquelle viendra se loger le peptide antigénique. Elle peut accueillir des peptides d'une longueur de 8 à 10 acides aminés (aa), le plus souvent 9. La capacité de chaque molécule du CMH de classe I à fixer tel ou tel peptide est principalement liée à la présence de « résidus d'ancrage » dans le peptide reconnu. Ces résidus, situés en positions 2, (3) et 9 du peptide (**Figure 14**), vont permettre l'ancrage du peptide au sein de la cavité de la molécule du CMH appelée poche à peptide.



**Figure 14 - Conformation des peptides pouvant lier les molécules du CMH de classe I**

**D'après Parham P et al. 1992<sup>111</sup>**

Pour le CMH de classe I, les peptides présentables contiennent généralement un résidu d'ancrage hydrophobe en position carboxy-terminal (position 9) comme par exemple une leucine ou une isoleucine. Le répertoire peptidique présentable va donc varier selon la composition de la poche<sup>112</sup>. En effet, ces poches sont constituées de résidus très polymorphiques qui varient selon les différents haplotypes. Pour cette raison, un peptide capable de stimuler une réponse CTL chez un individu peut être complètement inactif chez la majorité des autres individus de HLA distinct. Par ailleurs, une protéine ne contient généralement qu'un seul peptide apte à être présenté efficacement (épitope dominant) par une molécule du CMH donnée. A noter que des peptides différents mais qui présentent une longueur correcte et des résidus d'ancrages identiques ou semblables vont pouvoir être reconnus par une même molécule du CMH. Un même peptide peut aussi être reconnu par plusieurs molécules CMH différentes. Au final, les CTL vont reconnaître le complexe CMH-peptide exprimé à la surface de la cellule cible grâce à leur TCR. En parallèle, leur récepteur CD8 reconnaît le domaine proximal non polymorphique  $\alpha_3$  de la molécule de CMH de classe I. Il va alors y avoir activation des voies de transduction de signaux qui vont conduire à la production de cytokines et la dégranulation (granzymes, perforines) des CTL, entraînant la mort de la cellule infectée<sup>113</sup>. Les CTL activés sont également capables d'induire l'apoptose de la cellule cible via la voie de récepteurs à domaine de mort (Fas/FasL).

Le CMH définit donc un répertoire de peptides capables d'être présentés qui va conditionner la réponse CTL vis-à-vis de certains antigènes. Certains individus seront capables de répondre efficacement à un antigène donné tandis que d'autres seront incapables de le reconnaître. On parle de bon ou de mauvais répondeur.

### 7.3 HLA de classe I et progression de la maladie

Au cours de l'infection par le VIH-1, des associations ont été décrites entre certains allèles HLA de classe I et l'évolution de la maladie. En effet, l'étude des facteurs génétiques a rapidement permis de montrer qu'il existait une surreprésentation de certains haplotypes HLA de classe I parmi les patients *controllers*. Les allèles HLA-B\*57 et HLA-B\*27 ont été les premiers décrits comme étant associés à une virémie plus faible et une progression vers le stade SIDA plus lente<sup>114</sup>. De nombreuses autres études ont permis de confirmer ces premières observations et d'identifier de nombreux autres allèles dit protecteurs, ou à l'inverse des allèles associés à une évolution plus rapide de la maladie comme le HLA-B\*35 ou HLA-B\*08 (résumés dans le **Tableau 5**).

Le HLA-B constitue la molécule du CMH la plus souvent identifiée comme étant reliée avec la vitesse de progression de la maladie. Une des explication est liée à la forte diversité des molécules HLA-B par rapport aux molécules HLA-A et HLA-C, qui leur permet de fixer une plus grand nombre de peptides<sup>115,116</sup>. Par ailleurs, des études ont montré que les CTL restreints par les molécules HLA-B posséderaient des capacités prolifératives plus importantes ainsi qu'un caractère polyfonctionnel leur permettant d'à la fois de produire des cytokines et de sécréter des granules lytiques<sup>117</sup>. Toutefois, le mécanisme précis par lequel certains allèles HLA-B conduisent au contrôle de la CV n'est pas totalement élucidé. En effet, curieusement, ces HLA-B protecteurs sont très différents entre eux : ils n'appartiennent pas aux mêmes supertypes et peuvent même avoir des actions inverses selon le sous-type viral et la zone géographique étudiée (exemple du HLA-B\*51:01). De plus, le fait de posséder un HLA dit protecteur n'est pas un critère suffisant pour contrôler la réplication du virus. Le VIH-1 est en effet capable d'échapper au système immunitaire de l'hôte en modulant l'expression des molécules du CMH-1 à la surface des cellules infectées par l'intermédiaire de *nef*<sup>118</sup> ainsi qu'en introduisant des mutations au sein des épitopes CTL. C'est l'échappement moléculaire.

**Tableau 5 - Associations entre progression de l'infection à VIH-1 et allèles HLA-I correspondants adapté d'après Goulder et al. 2012<sup>119</sup>**

Allèles protecteurs		Allèles associés à un risque de progression rapide	
A*25/25:01	Clade B : caucasiens	A*36:01	Clade C : Afrique Australe
A*32/32:01	Clade B : caucasiens, Nord/Afro-Américains	B*07:02	Clade B : caucasiens
A*74/74:01	Clade B : Afro-Américains, Clade C : Afrique Australe Clade A, C, D : Tanzanie	B*08/08:01	Clade B : caucasiens Clade C : Afrique Australe
B*13:02	Clade B : caucasiens, Clade C : Afrique du Sud	B*18/18:01	Clade C : Afrique Australe
B*14/14:02	Clade B : caucasiens, Afro-américains	B*35	Clade B : caucasiens
B*27/27:05	Clade B : caucasiens	B*35:01	Clade B : Amérique du Nord, Europe
B*42:01	Clade C : Afrique Australe	B*35:02/35:03	Clade B : caucasiens
B*44:03	Clade C : Afrique Australe	B*45/45:01	Clade C : Afrique Australe
B*51	Clade B : caucasiens	B*51:01	Clade C : Afrique Australe
B*52:01	Clade B : caucasiens	B*53:01	Clade B : caucasiens, Afro-Américains
B*57:01	Clade B : caucasiens, Hispaniques	B*54/55/56	Clade B : caucasiens
B*57:02	Clade C : Afrique du Sud	B*58:02	Clade C : Afrique du Sud, Zambie
B*57:03	Clade A : Rwanda Clade B : Afro-Américains Clade C : Afrique Australe		
B*58:01	Clade C : Afrique Australe		
B*81:01	Clade C : Afrique Australe Clade B : Afro-Américains		

Par ailleurs, l'homozygotie des molécules HLA de classe I est associée à une progression plus rapide de la maladie, probablement du fait d'un répertoire T moins diversifié.

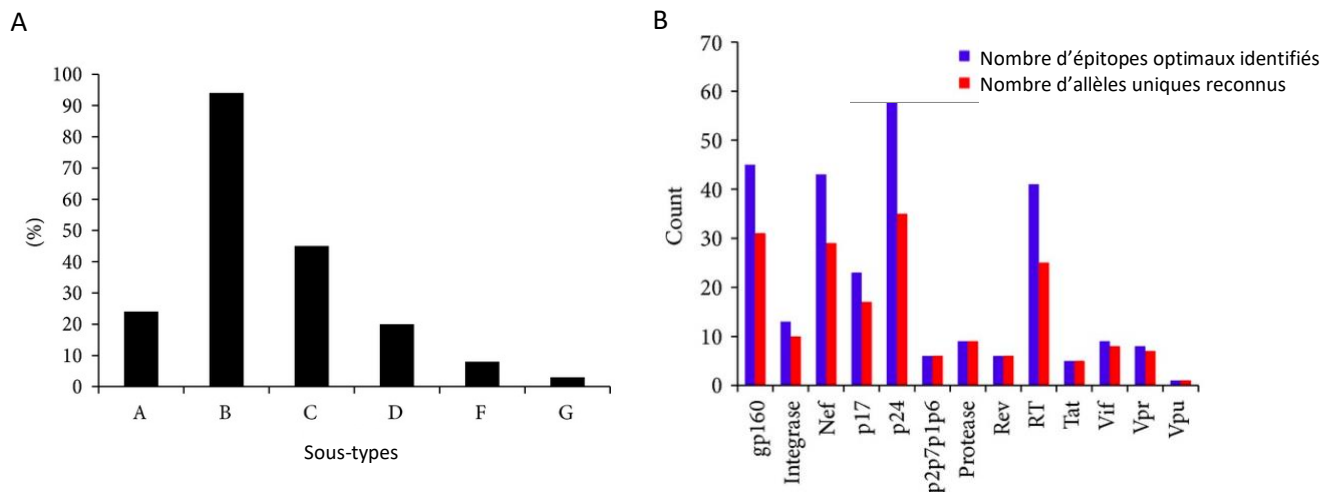
## 7.4 Echappement moléculaire et évolution de la réponse cytotoxique

De la même façon que le virus est capable d'échapper aux TAR grâce à l'émergence de mutants résistants, la pression de sélection exercée par les CTL spécifiques des épitopes dominants va également rapidement conduire à la sélection de nouveaux variants possédant des épitopes mutés non reconnus<sup>120-122</sup>. Ces mutations vont pouvoir affecter la reconnaissance des épitopes par les molécules du CMH de classe I ou par le TCR. Elles apparaissent dès la phase aiguë de l'infection et vont s'accumuler au cours de l'évolution de la maladie, ce qui impose une adaptation constante des réponses immunitaires. Après un délai plus ou moins long, le déclin des fonctions auxiliaires des lymphocytes CD4+ nécessaires à cette adaptation et l'accumulation de mutations d'échappement, vont progressivement conduire jusqu'au stade SIDA. A ce stade, bien que des taux importants de CTL persistent, la réponse CTL n'est plus en mesure de contrôler la réplication du virus qui échappe totalement au système immunitaire.



## 7.5 Epitopes CTL du VIH-1

Le premier épitope CTL du VIH-1 a été identifié au sein de *gag* en 1988<sup>123</sup>. Depuis, de nombreux épitopes capables de stimuler une réponse CTL chez les individus infectés par le VIH-1 ont été identifiés dans le protéome du VIH-1. Ils sont répertoriés au sein de la base de données du Laboratoire National de Los Alamos accessible sur le lien : <http://www.hiv.lanl.gov/content/immunology/index.html>. Les épitopes les mieux caractérisés, c'est à dire pour lesquels on a le plus de preuves de l'immunogénicité, sont publiés au sein de la « A-list » qui est régulièrement mise à jour<sup>124</sup>. Un extrait de cette liste est disponible en **ANNEXE 1**. La majorité de ces épitopes ont été décrits à partir de séquences de sous-type viraux de type B, et dans une moindre mesure des autres sous-types (**Figure 15. A**). L'analyse de cette base donnée révèle que 80% des épitopes CTL optimaux présents dans la « A-list » ont été identifiés à partir de 5 protéines du VIH-1 : gp160, *nef*, p24, p17 et RT (**Figure 15. B**). Leur identification repose classiquement sur l'éluion des peptides à partir des cellules présentatrices d'antigènes et leur caractérisation par spectroscopie de masse, mais aussi sur des tests *in vitro* d'activation et de prolifération lymphocytaires T. Bien que non suffisants pour affirmer qu'un peptide sera réellement présenté, des logiciels de prédiction des affinités de liaison relative des épitopes des lymphocytes T sont disponibles. Ils tiennent notamment compte de l'accessibilité de l'épitope au clivage par le protéasome selon la nature de ses résidus, de sa capacité à se fixer sur TAP et de ses résidus d'ancrage.



**Figure 15 - Analyses des épitopes CTL optimaux du VIH-1 répertoriés au sein de la base de données de Los Alamos**

Adapté d'après Chakraborty et al. 2014<sup>125</sup>

## OBJECTIFS DE L'ETUDE

La réponse cellulaire faisant intervenir les CTL semble jouer un rôle central dans le contrôle de l'infection pour le VIH-1. Un vaccin impliquant la stimulation de ces CTL constitue donc une stratégie prometteuse dans la lutte contre le virus. Cependant, l'extrême variabilité du virus et sa capacité à muter rapidement pour échapper au système immunitaire constituent des obstacles majeurs pour l'élaboration de ce type de vaccin.

Dans cette étude, nous proposons d'identifier des épitopes CTL conservés au sein des protéines RT, INT et PR qui seront destinés à l'élaboration d'un vaccin thérapeutique multi-peptidique, considérablement plus complexe que ceux testés jusqu'ici, adapté aux caractéristiques génétiques dominantes de la population (HLA).

Les objectifs de l'étude sont :

- Caractériser des épitopes CTL HLA-B restreints archivés au sein de l'ADN-proviral des patients étudiés :
  - décrits dans la base de données de Los Alamos
  - encore jamais décrits, grâce au découpage des séquences d'ADN proviral en peptides de 8 à 10 aa via le logiciel TutuGenetics
- Evaluer leur variabilité au sein de la cohorte
- Evaluer l'impact de cette variabilité sur leur affinité théorique pour la molécule HLA et donc l'impact potentiel sur leur capacité à être présentés
- Identifier des épitopes conservés ou des épitopes dont les variants sont théoriquement toujours reconnus par la molécule HLA-B pour entrer dans la composition d'un vaccin multi-peptidique visant à stimuler la réponse CTL.

# MATERIELS ET METHODES

## 1. Population étudiée

### 1.1 Population source

Cette étude rétrospective a été réalisée en utilisant des données collectées chez des patients infectés par le VIH-1 pris en charge au CHU de Bordeaux ayant bénéficié d'un typage HLA-B entre janvier 2009 et janvier 2017.

### 1.2 Critères d'inclusion dans l'étude

A partir de cette population source de patients, ont été sélectionnés pour cette étude, ceux qui répondaient aux critères suivants :

- Être porteur d'au moins un allèle HLA-B parmi les plus fréquents dans la population caucasienne ou africaine.
- Avoir bénéficié d'un génotypage de résistance aux anti-retroviraux sur l'ADN proviral.
- Être en succès virologique depuis plus de 6 mois (seuil : CV < 50 copies).
- N'avoir jamais répliqué sous traitement (seuil : CV < 50 copies).

L'ensemble des patients inclus dans l'étude avait donné leur consentement libre et éclairé, écrit avec capacité requise de compréhension dans le cadre de la prescription de typage HLA hors greffe.

### 1.3 Recueil de données

Les caractéristiques démographiques (âge, sexe), cliniques et thérapeutiques de chaque patient ont été recueillies à partir des courriers d'hospitalisation via le logiciel DxCare® et les données biologiques ont été extraites à partir des systèmes informatiques du laboratoire (Bayer® pour les données avant 2007, Synergie® après 2007). Ont été retenus pour la base de données :

- La date du diagnostic
- Le sous-type viral
- Le typage HLA-B du patient
- La date de mise sous TAR
- L'ensemble des charges virales réalisées depuis la mise sous TAR
- La date de réalisation du génotypage sur ADN proviral

## **2. Typage HLA de classe I locus B**

Depuis une dizaine d'années, le typage HLA de classe I locus B doit être réalisé avant l'instauration de tout TAR contenant de l'abacavir (inhibiteurs nucléosidiques de la transcriptase inverse) afin de rechercher l'allèle HLA-B\*57:01 qui est associé à un risque significativement majoré de réaction d'hypersensibilité<sup>126,127</sup>. Nous avons donc utilisé pour cette étude, les données du typage HLA-B des patients infectés par le VIH-1 réalisé au laboratoire d'immunologie du CHU de Bordeaux. Les typages sont réalisés par biologie moléculaire à l'aide de deux techniques : la PCR-SSO (*Polymerase Chain Reaction Sequence Specific Oligonucleotides*) et PCR-SSP (*Single Specific Primer*). Dans les deux cas, l'ADN est d'abord extrait à partir du sang total du patient puis amplifié par PCR.

### **2.1 PCR SSO reverse LUMINEX**

Dans ce cas, les exons polymorphes des gènes HLA sont amplifiés avec des amorces spécifiques de chaque locus. L'ADN marqué est ensuite hybridé avec des billes fluorescentes couplées à des sondes oligonucléotidiques spécifiques d'un ou plusieurs allèles pour chaque locus<sup>128</sup>. Chaque bille possède donc une caractéristique de fluorescence. La suspension de bille est ensuite analysée par cytométrie en flux à l'aide du Luminex LABScan (One Lambda). Le logiciel FUSION permet ensuite de compiler les données et de déterminer le génotype du patient.

### **2.2 PCR SSP**

En cas d'échec ou d'ambiguïté, une PCR-SSP peut être réalisée. Dans ce cas, l'amplification se fait en présence d'un panel d'amorces spécifiques de chaque allèle. Les produits d'amplification obtenus sont soumis à une électrophorèse sur gel d'agarose 2,5% contenant un agent intercalant. Les bandes d'ADN sont visualisées sous rayons ultra-violet. Si l'amplification a eu lieu, elle témoigne de la présence de l'allèle ou du groupe d'allèles ciblés par les amorces. Les bandes correspondant à une amplification spécifique sont ensuite analysées afin d'assigner un allèle.

### **3. Séquençage de l'ADN proviral**

La détermination du génotype de résistance à partir des ARN viraux plasmatiques s'est imposée comme la technique de référence pour le suivi des patients en routine pour évaluer la résistance aux antirétroviraux. Cependant il présente certaines limites, notamment l'impossibilité de leur réalisation lorsque la CV plasmatique est trop faible ou indétectable. Dans certaines situations particulières, par exemple en vue de l'optimisation d'un TAR en situation de succès virologique, Il est possible de déterminer le génotype de résistance à partir de l'ADN proviral (Optimisation d'un traitement antirétroviral en situation de succès virologique, Rapport Morlat - Juillet 2017).

Dans cette étude, nous nous sommes servis des séquences déjà générées des gènes codant les protéines cibles des ARV obtenues à partir du séquençage de l'ADN proviral réalisé en routine dans le laboratoire de virologie du CHU de Bordeaux par la méthode Sanger automatisée. En effet l'ensemble des séquences produites et analysées sont systématiquement archivées dans la base de données « SmartGene » commune au laboratoire de virologie de l'hôpital Pellegrin et au laboratoire de recherche de l'université Victor Segalen Bordeaux 2 dirigé par le Pr Fleury.

#### **3.1 Principe du séquençage par la méthode Sanger**

Découverte à la fin des années 1970, la méthode de séquençage de Sanger est aujourd'hui encore largement employée et reste la technique de référence pour la réalisation des tests génotypiques de résistance du VIH.

Elle repose sur l'utilisation de didésoxynuléotides (ddNTP) terminateurs de chaîne<sup>129</sup> et marqués par fluorescence qui vont bloquer l'élongation du brin par l'ADN polymérase. Sur le principe, le mélange réactionnel de la réaction de séquençage contient l'amplicon à séquencer, l'amorce, une ADN polymérase, des dNTP et des ddNTP dans une proportion minoritaire par rapport au dNTP (environ 1/10) mais suffisante pour être statistiquement présents à chaque position du brin d'ADN. Ainsi le ddNTP va permettre de synthétiser toutes les copies partielles intermédiaires possibles de la molécule d'ADN à séquencer grâce à son action terminateur de chaîne. Ces fragments sont ensuite séparés selon leur taille par une électrophorèse capillaire et la détection des fluorochromes par laser permet de reconstituer la séquence de départ.

### **3.2 Tests génotypiques de résistance sur ADN proviral réalisés au CHU de Bordeaux**

Pour la réalisation de la réaction de séquence, le laboratoire suit le protocole régulièrement mis à jour de l'ANRS (<http://www.hivfrenchresistance.org/ANRS-procedures.pdf>). L'étude portant sur des génotypages effectués entre 2010 et 2017, les réactifs ainsi que les amorces et sondes utilisés ont évolué au cours des années mais le principe est resté le même.

L'ADN total, contenant l'ADN proviral intégré, est extrait de façon automatisée à partir du sang total puis deux PCR successives sont réalisées. Une première PCR classique suivie d'une deuxième appelée PCR nichée (nested PCR) qui va amplifier le produit issu de la première PCR à l'aide d'un couple d'amorces distinct capable de s'hybrider à une partie interne de la séquence précédemment amplifiée. La PCR nichée a pour intérêt d'augmenter la sensibilité et la spécificité de la réaction. Les produits issus de la deuxième PCR sont séparés par une électrophorèse sur gel d'agarose à 2% afin de vérifier l'efficacité de l'amplification puis purifiés pour garder uniquement les amplicons d'ADN. Enfin la réaction de séquences bidirectionnelles selon la méthode de Sanger est réalisée sur système Applied Biosystems 3500 xL Dx Genetic Analyser. Les séquences nucléotidiques obtenues sont ensuite traduites en séquences protéiques et comparées avec les séquences de référence à l'aide de l'algorithme d'interprétation établi chaque année par le groupe Résistance de l'ANRS-AC11.

#### 4. Calcul du MHC IC<sub>50</sub> et logiciel TutuGenetics

L'affinité d'une molécule HLA pour un épitope peut être évaluée par le MHC IC<sub>50</sub> que l'on abrégera par IC<sub>50</sub> (exprimé en nM) qui correspond un indice théorique de présentation. Ce score peut être calculé en combinant pour un peptide donné les prédictions de dégradation par le protéasome, leur transport par TAP et leur fixation au HLA. Pour ce faire, il est possible de croiser les séquences des épitopes avec le HLA du patient en utilisant les algorithmes du site de l'Immuno Epitope Data Base (IEDB)<sup>130-133</sup> accessibles gratuitement (<http://tools.immuneepitope.org/processing>). Ces algorithmes vont permettre de prédire l'affinité du HLA pour le peptide et d'identifier la capacité intrinsèque de chaque peptide à être un épitope potentiel pour les lymphocytes T. Plus la valeur de l'IC<sub>50</sub> est basse, plus l'affinité est bonne. Un score < 50 nM indique une forte affinité entre le HLA et le peptide. Entre 50 et 500 nM une affinité moyenne. Au-delà de 500 nM, on considère que la reconnaissance de l'épitope par ce HLA n'est plus possible en théorie.

Tutugenetics est un logiciel en ligne de commande programmé en langage C mis au point dans le cadre du projet Provir<sup>134</sup>. Il est capable à partir (i) de l'alignement nucléotidique d'une séquence virale par rapport à la référence HxB2, (ii) d'un gène spécifié et (iii) du typage HLA d'un patient donné, d'instrumentaliser les algorithmes IEDB pour déterminer la prédiction de l'affinité entre un HLA et un peptide (**Figure 16**). L'alignement nucléotidique est d'abord traduit en aa selon l'ORF (*Open Reading Frame*) du gène spécifié. Puis, TutuGenetics effectue un découpage séquentiel de la séquence virale par des pas de 8 à 10 aa, dans le but d'identifier de nouveaux épitopes potentiellement présentables par les molécules HLA de classe I. Le logiciel permet ensuite d'automatiser les algorithmes IEDB pour étudier la prédiction de reconnaissance entre un potentiel épitope et la molécule HLA. Un score IC<sub>50</sub> est ainsi déterminé pour chaque couple HLA-peptide. Au final, le logiciel génère un fichier CVS (*Comma-Separated Values*) résumant les allèles HLA du patient, la position de l'épitope par rapport à HxB2, sa séquence, le nombre de variants, le pourcentage de lectures contenant cet épitope et la valeur de son IC<sub>50</sub>.

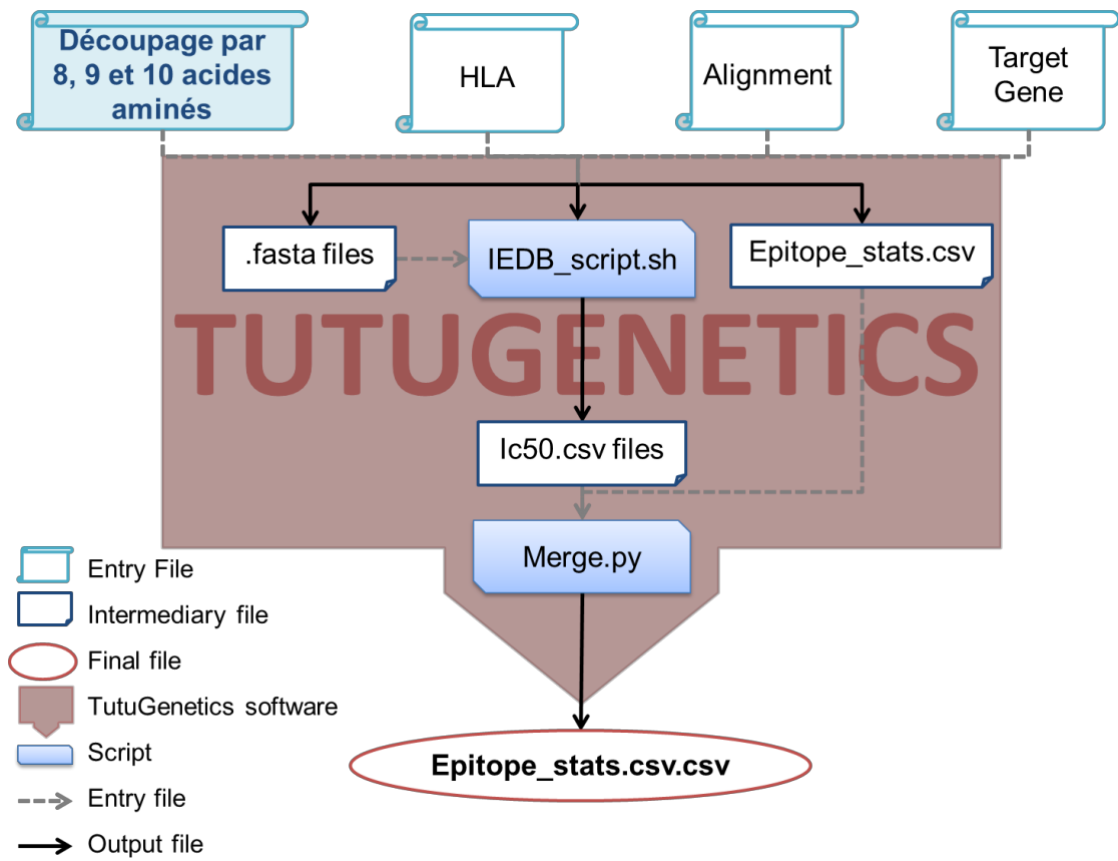


Figure 16 - Principe de fonctionnement du logiciel TutuGenetics

D'après Tumiotto et al. 2017<sup>134</sup>



## RESULTATS

### 1. Sélection des patients inclus dans l'étude

Au cours de la période allant de janvier 2009 à janvier 2017, 979 patients infectés par le VIH-1 ont bénéficié d'un typage HLA-B au CHU de Bordeaux. Parmi eux, 417 ont d'emblée été exclus car ils ne présentaient pas au moins un allèle appartenant aux allèles HLA-B les plus représentés dans la population caucasienne et africaine (**Tableau 6**). 562 patients (57,4 %) ont donc initialement été retenus pour l'étude.

Concernant la population caucasienne, une liste des allèles HLA-B les plus représentés a été établie en accord avec les données du laboratoire d'immunologie de Bordeaux et la littérature<sup>135</sup>.

Pour la population africaine, peu de données sont disponibles. Devant la variabilité importante de la répartition des différents allèles entre les pays et leur faible représentation dans notre population, seuls les trois allèles les plus fréquents ont été retenus. Les pourcentages rapportés dans le tableau pour la population africaine correspondent à une moyenne des fréquences alléliques publiées pour la Côte d'Ivoire, le Cameroun, l'Ouganda et le Kenya dans la base de données AFND (Allele Frequency Net Database) accessible gratuitement en ligne.

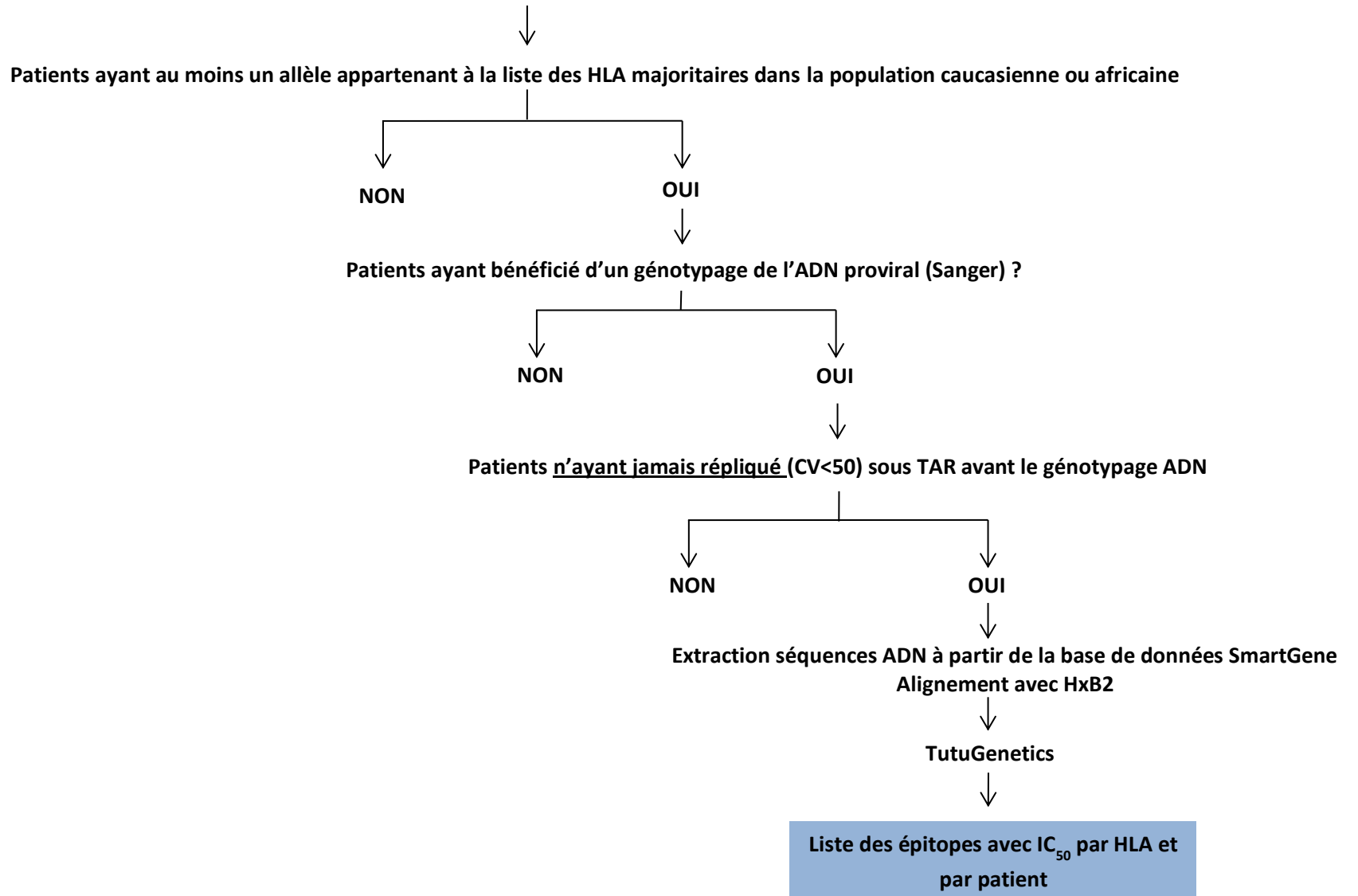
**Tableau 6 - Allèles HLA-B les plus représentés dans la population caucasienne et la population africaine**

Population caucasienne <sup>135</sup>			Population africaine		
HLA moléculaire	HLA sérologique	%	HLA moléculaire	HLA sérologique	%
B*07:02	B*07	10,39	B*53:01	B*53	11,79
B*08:01	B*08	9,05	B*35:01	B*35	9,36
B*35:01	B*35	6,54	B*07:02	B*07	6,10
B*44:02	B*44	6,36			
B*15:01	B*62	5,55			
B*18:01	B*18	5,46			
B*51:01	B*51	5,28			
B*44:03	B*44	4,12			

Le schéma de l'étude est présenté en **Figure 17**. Parmi les patients présentant au moins un allèle appartenant aux allèles HLA-B les plus représentés, seuls 207 avaient bénéficié d'un génotypage à partir de l'ADN proviral. Et parmi ces 207 patients, 154 ont été exclus car ils ont présenté au moins une fois une CV supérieure à 50 avant la réalisation du génotypage sur l'ADN proviral. Au final, 53 patients ont été inclus dans l'étude.

979

Patients infectés par le VIH-1 pris en charge au CHU de Bordeaux ayant bénéficié d'un typage HLA-B



562

207

53

Figure 17 - Schéma de l'étude

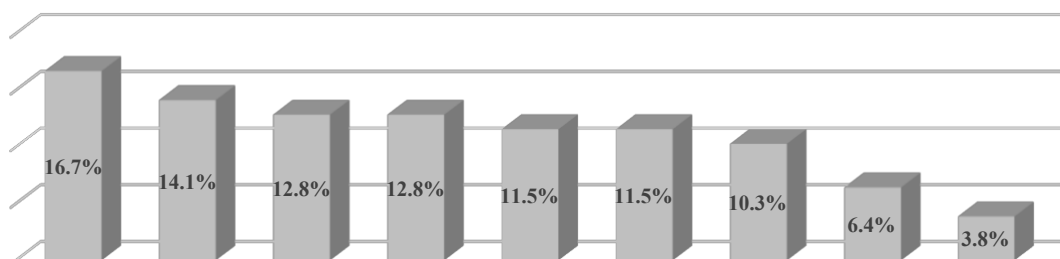
## 2. Caractéristiques clinico-biologiques des patients inclus dans l'étude

Les caractéristiques cliniques et biologiques des patients inclus dans l'étude sont présentées dans le **Tableau 7**. Le détail pour chaque patient est disponible en **ANNEXE 2**. L'âge médian des patients enrôlés était de 49,9 ans (28,2-74,4 ans) avec un ratio homme/femme de 2,53. La plupart des malades étaient infectés par un virus de sous-type B (69,81 %) tandis que le CRF 02\_AG était retrouvé en deuxième position (15,09 %). Trente-trois patients (62,26 %) avaient reçu un TAR dans l'année qui a suivi le diagnostic. Enfin, l'ensemble des patients avaient une CV < 50 copies/mL pendant toute la durée de l'étude (les *blips* étaient un critère d'exclusion). A noter qu'un des patients était *controller*.

**Tableau 7 - Principales caractéristiques clinico-biologiques des patients inclus dans l'étude**

Paramètre	n	Pourcentage
<b>Age</b>		
Médiane	49,9 ans	
Extrêmes	28,2-74,4 ans	
<b>Sexe</b>		
Femme	15	28,30%
Homme	38	71,70%
<b>Sous type viral</b>		
B	37	69,81%
CRF02_AG	8	15,09%
G	2	3,77%
Autres (<2) : CRF06, CRF01_B, CRF45_cpx, F1	4	7,54%
Indéterminé	1	1,89%
<b>Délai entre le diagnostic et la mise en place d'un TAR</b>		
≤ 1 an	33	62,26%
2-5 ans	9	16,98%
6-10 ans	6	11,32%
> 10 ans	1	1,89%
Inconnu	3	5,66%
<i>Controller</i>	1	1,89%
<b>Délai entre date du diagnostic et date du génotypage ADN</b>		
1 an	5	9,43%
2-5 ans	20	37,74%
6-10 ans	10	18,87%
10-25 ans	14	26,42%
> 25 ans	2	3,77%
Inconnu	2	3,77%

La prévalence des allèles HLA-B étudiés chez les patients sélectionnés est présentée dans la **Figure 18**. L'allèle HLA-B\*51:01 était le plus représenté et était présent chez 16,7% de notre population, suivi par les allèles B\*44:03, B\*44\*02 et B\*07:02.



	<b>B*51:01</b>	<b>B*44:03</b>	<b>B*44:02</b>	<b>B*07:02</b>	<b>B*08:01</b>	<b>B*35:01</b>	<b>B*15:01</b>	<b>B*18:01</b>	<b>B*53:01</b>
■ %	16,7%	14,1%	12,8%	12,8%	11,5%	11,5%	10,3%	6,4%	3,8%
<b>n</b>	13/14*	11	10	10	9	9/11*	8/9*	5	3

\*Patients homozygotes

**Figure 18 - Répartition des allèles HLA-B majoritaires chez les patients étudiés**

### 3. Identification sélective d'épitopes CTL conservés restreints aux molécules HLA-B

Les séquences nucléotidiques des gènes codant pour la RT (à minima), et si disponibles, l'INT et la PR (**Tableau 8**) des virus de chaque patient, ont été analysées à l'aide du logiciel TutuGenetics afin de déterminer la présence ou non d'épitopes potentiellement présentables par le HLA-B des patients correspondants. Conformément à ce qui est communément admis, ont été pris en compte (i) les peptides épitopiques possédant un score  $IC_{50} < 50$  nM pour la molécule HLA étudiée présageant une liaison de forte affinité (ii) les peptides possédant un  $IC_{50}$  compris entre 50 et 500 nM présageant d'une affinité moyenne pour la molécule HLA. On admettra que les deux types d'épitopes sont donc théoriquement présentables par la molécule HLA étudiée. Une liste d'abréviations des aa est disponible en **ANNEXE 3**.

**Tableau 8 - Nombre de gènes séquencés en fonction du HLA-B des patients de la cohorte**

	<b>B*51:01</b>	<b>B*44:03</b>	<b>B*44:02</b>	<b>B*07:02</b>	<b>B*08:01</b>	<b>B*35:01</b>	<b>B*15:01</b>	<b>B*18:01</b>	<b>B*53:01</b>
<b>RT</b>	12/13*	11	10	10	9	9/11*	7/8*	5	3
<b>INT</b>	12	10	7	9	6	7	6	5	2
<b>PR</b>	12/13*	11	10	10	9	8/10*	6	5	3

\*Patients homozygotes

### 3.1 Analyse de la RT

#### 3.1.1 Épitopes restreints au HLA-B\*07:02

L'allèle HLA-B\*07:02 est un allèle particulièrement intéressant dans une optique de vaccination tenant compte de la génétique des patients puisqu'il est fréquemment représenté à la fois dans la population caucasienne et dans la population africaine. Dans notre population, 10/53 patients possédaient l'allèle HLA-B\*07:02. L'analyse des séquences correspondant à ces patients a permis d'identifier l'épitope conservé SPAIFQSSM situé en position RT(156-164) de la séquence de référence HxB2 (**Tableau 9**). Il est retrouvé chez 100% des séquences étudiées, aussi bien chez les sous-types B, G et CRF02\_AG. Comme décrit dans la littérature, cet épitope présente un polymorphisme<sup>136</sup> de séquence au niveau du résidu 162 (SPAIFQSSM), mais qui ne semble pas affecter la capacité de présentation du peptide par la molécule HLA-B\*07:02. En effet, dans sa forme sauvage l'épitope SPAIFQSSM présente un IC<sub>50</sub> égal à 9 nM indiquant une présentation théorique optimale. Les formes mutées quant à elles conservent toutes un IC<sub>50</sub> inférieur à 50 nM, à l'exception du peptide SPAIFQWSM qui possède une mutation S (sérine) → W (tryptophane). Cette mutation induit une augmentation de l'IC<sub>50</sub> à 71,3 nM prédisant une légère perte d'affinité pour la molécule HLA, tout en conservant une bonne présentation théorique. A noter, que deux (souches 5097 et 4071) voire quatre versions (souche 6214) du peptide peuvent être présentes dans l'ADN proviral d'un même individu à une fréquence égale ou supérieure à 20 % puisque la méthode Sanger n'est capable de détecter que les variants avec une prévalence d'au moins 20%.

**Tableau 9 - Épitope restreint par le HLA-B\*07:02 présentant un IC<sub>50</sub> < 50 nM**

Souche	Sous type	Position (Hxb2) Épitope IC <sub>50</sub>	RT(156-164)					
			SPAIFQSSM 9 nM	SPAIFQSSM 10,4 nM	SPAIFQASM 11,4 nM	SPAIFQNSM 14,7 nM	SPAIFQCSM 20,1 nM	SPAIFQWSM 71,3 nM
HxB2	B		1					
6469	B		1					
5578	B		1					
5097	B		1			1		
4071	B		1				1	
6214	B		1	1	1		1	
2078	B							1
4728	B				1			
1488	/		1					
5179	G						1	
5679	02_AG				1			

Enfin, cet épitope fait partie de la « A-list » qui recense les épitopes CTL du VIH-1 les mieux définis expérimentalement, ce qui fait un argument supplémentaire pour retenir ce peptide pour la composition d'un vaccin lipopeptidique capable de stimuler la réponse CTL chez les patients possédant l'allèle HLA-B\*07:02.

Si l'analyse est étendue jusqu'aux peptides présentant un  $IC_{50} < 500$  nM, c'est-à-dire aux peptides possédant une liaison de plus faible affinité mais potentiellement présentables par la molécule HLA-B\*07:02, la souche de référence HxB2 contient huit épitopes théoriquement présentables au sein du gène codant la RT (**Tableau 10**, peptides **en gras**).

**Tableau 10 - Épitopes restreints par le HLA-B\*07:02 présentant un  $IC_{50} < 500$  nM**

Position	Peptide	Taille (aa)	$IC_{50}$ (nM)	Fréquence	Los Alamos
RT(3-12)	<b>SPIETVPVKL</b>	10	377	10/10	Oui
RT(18-26)	<b>GPKVKQWPL</b>	9	114,2	9/10	Oui
	GPRVKQWPL	9	22,5	1/10	
RT(51-60)	<b>GPENPYNTPV</b>	10	327,8	8/10	Non
	GPENPYNTPI	10	238,4	3/10	
RT(54-63)	<b>NPYNTPVFAI</b>	10	460,5	8/10	Non
	NPYNTPIFAI	10	452,7	3/10	
RT(149-158)	<b>LPQGWKGSPA</b>	10	78,7	10/10	Non
RT(155-164)	<b>GSPAIFQSSM</b>	10	87	6/10	Non
	GSPAIFQGS <u>M</u>	10	115,5	1/10	
	GSPAIFQAS <u>M</u>	10	118,4	3/10	
	GSPAIFQNS <u>M</u>	10	185,2	1/10	
	GSPAIFQCS <u>M</u>	10	227,7	3/10	
	GSPAIFQWS <u>M</u>	10	<b>1245,5</b>	1/10	
RT(156-165)	<b>SPAIFQSSMT</b>	10	311,8	5/10	Oui
	SPAIFQGS <u>M</u> T	10	379,7	1/10	
	SPAIFQAS <u>M</u> T	10	409,4	3/10	
	SPAIFQNS <u>M</u> T	10	<b>654</b>	1/10	
	SPAIFQCS <u>M</u> T	10	<b>704,1</b>	3/10	
	SPAIFQWS <u>M</u> T	10	<b>2135,4</b>	1/10	
RT(235-244)	<b>HPDKWTVQPI</b>	10	53,9	8/8*	Non

\*2 séquences avec séquençage incomplet

La colonne « **Position** » correspond à la position du peptide dans la séquence de référence HxB2.

La colonne « **Peptide** » correspond au peptide retrouvé chez les différents patients avec en **gras**, le peptide sauvage présent dans la séquence de référence HxB2.

La colonne «  **$IC_{50}$**  » précise l'indice théorique de présentation calculé de chaque peptide en fonction du HLA-B, les valeurs en **rouge** indiquent un ligand théoriquement non reconnu ( $> 500$  nM).

La colonne « **Fréquence** » indique le nombre de séquences possédant cette version du peptide sur le nombre de séquences totales analysées.

La colonne « **Los Alamos** » précise si oui ou non le peptide identifié appartient à la liste des épitopes CTL du VIH-1 vérifiés expérimentalement et présentables par le HLA-B indiqué, ou s'il appartient à la « A-List ».

Les épitopes RT(3-12), RT(149-158) ainsi que RT(235-244) sont retrouvés dans 100% des séquences de notre population sous leur forme sauvage, suggérant que ces peptides sont très conservés. A l'inverse, les épitopes identifiés en position RT(18-26), RT(51-60) et RT(54-63) sont eux être retrouvés mutés chez certains patients. Cependant ces mutations ne semblent pas impacter négativement la présentation par la molécule HLA-B\*07:02. Elles semblent au contraire la potentialiser comme par exemple pour l'épitope RT(18-26) qui, lorsque le résidu lysine (K) est substitué par un résidu arginine (R), présente une diminution de l'IC<sub>50</sub> de 114,2 à 22,5 nM. Enfin, on identifie les peptides présents en position RT(155-165) et RT(156-165) de HxB2 qui contiennent tous les deux le résidu 162 présentant le polymorphisme déjà évoqué précédemment. A nouveau ce polymorphisme (SPAIFQSSMT/GSPAIFQSSM) se traduit par une légère baisse d'affinité pour la molécule HLA-B\*07:02 notamment lors de la substitution de la sérine (S) par un résidu tryptophane (W) qui entraîne une variation de l'IC<sub>50</sub> de 87 à 1245 nM pour l'épitope RT(155-165) et de 311,8 nM à 2135 nM pour RT(156-165).

### 3.1.2 Épitopes restreints au HLA-B\*08:01

Pour l'allèle HLA-B\*08:01, présent chez 9/53 patients de l'étude (11,5%), à nouveau un seul épitope présentant un IC<sub>50</sub> < 50 nM est identifié. Il s'agit de l'épitope GPKVKQWPL situé en position RT(18-26). Il est retrouvé chez 100% des séquences de nos patients sous sa forme sauvage (**Tableau 11**). Il a une taille de 9 aa et présente un IC<sub>50</sub> égal à 41,5 nM. De façon intéressante, cet épitope pourrait présenter une reconnaissance croisée avec HLA-B\*07:02 (IC<sub>50</sub> égal à 114,6 nM) mais également avec HLA-B\*42:01 (IC<sub>50</sub> = 21,8 nM, données non présentées). De plus, cet épitope appartient à la liste des épitopes les mieux définis (A-list). RT(18-26) semble donc être un très bon candidat pour un futur vaccin.

**Tableau 11 - Épitope restreint par le HLA-B\*08:01 présentant un IC<sub>50</sub> < 50 nM**

Souche	Sous type	Position (Hxb2)	RT(18-26)
		Epitope IC <sub>50</sub>	GPKVKQWPL 41,5 nM
HxB2	B		1
6306	B		1
6384	B		1
1399	B		1
4890	B		1
376	B		1
6277	02_AG		1
5142	02_AG		1
6508	G		1
5179	G		1



Si on s'intéresse ensuite aux peptides présentant un  $IC_{50} < 500$  nM, 5 peptides peuvent être retenus (**Tableau 12**). Les deux premiers, RT(17-26) et RT(19-26), bien que très conservés, ne présentent pas de grand intérêt par rapport à l'épitope dominant RT(18-26) dont ils dérivent puisqu'ils sont théoriquement moins bien présentés par la molécule HLA-B\*08:01 ( $IC_{50}$  égal à 379,8 et 227,5 nM respectivement). Deux autres épitopes sont identifiés en position RT(100-108) et RT(100-109) avec un  $IC_{50}$  égal à 320,9 et 396,4 nM respectivement. Chez 7 patients sur 9, cet épitope est retrouvé identique à l'épitope de référence HxB2. Une des souches possède une mutation en position 2 du peptide ce qui a pour conséquence d'augmenter l'affinité théorique de la molécule HLA pour le peptide. Il n'a donc à priori pas de conséquence négative pour la présentation du peptide. Par contre, le peptide retrouvé chez le sous-type G (patient 6508) présente une mutation sur le 3<sup>ème</sup> aa qui correspond au remplacement d'une lysine (K) par une glutamine (G). Les conséquences de cette mutation sont dramatiques pour la reconnaissance théorique du peptide par HLA-B\*08:01 puisque l' $IC_{50}$  du peptide muté est égal à 1419,2 pour RT(100-108) et 1108,3 nM pour RT(100-109). Un dernier épitope peut être identifié : RT(141-149). Il est retrouvé dans sa forme sauvage dans 7/9 séquences avec un  $IC_{50}$  égal à 255,8 nM. Cependant, une forme mutée est retrouvée chez trois patients (un patient possède une double population). Une des formes mutées présente une mutation au niveau du résidu 2 du peptide. Cette mutation provoque une légère augmentation de l' $IC_{50}$ , qui reste inférieur à 500 nM. A l'inverse, la souche 6508 (sous-type G) possède un acide glutamique (E) à la place d'une glutamine (Q) en 5<sup>ème</sup> position du peptide, ce qui impacte probablement la reconnaissance par la molécule HLA-B\*08:01 ( $IC_{50}$  égal à 1033,3 nM). Il conviendrait d'étudier la variabilité de cet épitope sur une plus grande population afin de déterminer si cette mutation est retrouvée chez tous les sous-types G et si elle est présente chez d'autres sous-types.

**Tableau 12 : Épitopes restreints par le HLA-B\*08:01 présentant un  $IC_{50} < 500$  nM**

Position	Peptide	Taille (aa)	$IC_{50}$ (nM)	Fréquence	Los Alamos
<b>RT(17-26)</b>	<b>DGPKVKQWPL</b>	10	379,8	9/9	Non
<b>RT(19-26)</b>	<b>PKVKQWPL</b>	8	227,5	9/9	Non
<b>RT(100-108)</b>	<b>LKKKKS<sup>R</sup>SVTV</b>	9	320,9	7/9	
	L <sup>R</sup> KKKS <sup>R</sup> SVTV	9	297,9	1/9	Non
	LK <sup>Q</sup> KKS <sup>R</sup> SVTV	9	<b>1419,2</b>	1/9 (G*)	
<b>RT(100-109)</b>	<b>LKKKKS<sup>R</sup>SVTVL</b>	10	396,4	7/9	
	L <sup>R</sup> KKKS <sup>R</sup> SVTVL	10	317,1	1/9	Non
	LK <sup>Q</sup> KKS <sup>R</sup> SVTVL	10	<b>1108,3</b>	1/9 (G*)	
<b>RT(141-149)</b>	<b>GIRYQYNVL</b>	9	255,8	7/9	
	G <sup>V</sup> RYQYNVL	9	378,9	2/9	Non
	GIRY <sup>E</sup> YNVL	9	<b>1033,3</b>	1/9 (G*)	

\*Mutation retrouvée uniquement dans la souche 6508 (sous-type G)

Légende : voir **Tableau 10**

### 3.1.3 Épitopes restreints au HLA-B\*44:02 et 44:03

Bien que l'on sache qu'ils soient très allogéniques l'un envers l'autre dans un contexte d'allogreffe, HLA-B\*44:02 et HLA-B\*44:03 sont très proches génétiquement. Ils présentent seulement un aa de différence en position 156 (Acide Aspartique vs Leucine). Par conséquent, ils possèdent un répertoire de peptides présentés très proche<sup>137</sup>. Pour cette raison nous étudierons de façon simultanée les deux allèles. Ils sont fréquemment retrouvés dans la population caucasienne et donc dans notre population. Parmi les 53 patients de l'étude, 17 possédaient l'un des deux allèles et 2 patients possédaient à la fois l'allèle HLA-B\*44:02 et l'allèle HLA-B\*44:03.

L'étude des séquences de RT de notre population n'a pas permis d'identifier de peptide conservé possédant un IC<sub>50</sub> inférieur à 50.

En étendant l'analyse aux peptides présentant un IC<sub>50</sub> < 500 nM, trois peptides peuvent être identifiés dans la séquence de référence HxB2. Il s'agit de RT(137-146), RT(203-212) et RT(223-232) dont les séquences sont présentées en **gras** dans le **Tableau 13**. En revanche, ils affichent tous une variabilité très importante chez nos patients, compromettant à la fois leur affinité pour la molécule HLA-B\*44:02 et pour HLA-B\*44:03. Par exemple, l'épitope EELRQHLLRW situé en position RT(203-212) de HxB2 est présent sous sa forme sauvage dans seulement 7 séquences sur les 17 et est retrouvé sous pas moins de 10 formes différentes avec des mutations au niveau des positions 1, 2, 5, 9 et 10. Ces mutations entraînent majoritairement une augmentation de l'IC<sub>50</sub> de l'épitope pour la molécule HLA et donc une diminution de sa capacité théorique à être présenté. Il ne semble pas y avoir de relation avec le sous-type viral et la présence de ces mutations, puisque les sous-types B, CRF02\_AG et CRF\_06 présentent tous les 3 des mutations (données non présentées). On constate également qu'il y a eu introduction de codons-stop dans certaines séquences des épitopes RT(203-212) et RT(223-232). En effet, les codons TGG codant pour le tryptophane (W) sont remplacés par des codons-stop TAG signant vraisemblablement l'activité de l'APOBEC3G.

**Tableau 13 - Épitopes restreints par le HLA-B\*44:02 et HLA-B\*44:03**

Position	Peptide	Taille (aa)	HLA B*44:02		HLA B*44:03		Los Alamos
			IC <sub>50</sub> (nM)	Fréquence	IC <sub>50</sub> (nM)	Fréquence	
RT(137-146)	NETPGIRYQY	9	452,3	6/10	299,7	8/11	Non
	NETPGVRYQY	9	470,4	1/10	/	/	
	NETPKIRYQY	9	483,3	1/10	/	/	
	NETPGIRYQY	9	<b>729,8</b>	1/10	<b>526,3</b>	1/11	
	NATPGIRYQY	9	<b>25555,7</b>	1/10***	<b>23889,6</b>	1/11***	
	NETPEIRYCY	9	/	/	236,5	1/11	
RT(203-212)	EELRQHLLRW	10	57,4	3/10	67,8	4/11	Oui
	EELRQHLLKW	10	54,1	2/10	65,4	5/11	
	EELREHLLKW	10	46,5	3/10	/	/	
	DELRQHLLRW	10	181,2	1/10	/	/	
	AELREHLLKW	10	/	/	19,9	1/11	
	EELRKHLLRW	10	/	/	110,3	1/11	
	EKLREHLLKW	10	/	/	<b>7163,4</b>	1/11	
	EELRQHLLR*	10	<b>Codon stop</b>		<b>Codon stop</b>	1/11	
	EELRKHLL*E	10	/	/	<b>Codon stop</b>	1/11	
	EELKQHLLK*	10	<b>Codon stop</b>		/	/	
RT(223-232)	KEPPFLWMGY	10	368,8	6/8**	230,4	8/10**	Non
	KEPPFL*IGY	10	<b>Codon stop</b>	1/8**	<b>Codon stop</b>	1/10**	
	KKPPFL*IGY	10	<b>Codon stop</b>	1/8**	/	/	
	KEPPFL*IRY	10	/	/	<b>Codon stop</b>	1/10**	
	KEPQFL*IRY	10	/	/	<b>Codon stop</b>	1/10**	

\* Codon stop

\*\* séquençage incomplet

\*\*\* Patient possédant à la fois les allèles HLA-B\*44:02 et HLA-B\*44:03

Légende : voir **Tableau 10**

### 3.1.4 Épitopes restreints au HLA-B\*35:01

L'allèle HLA-B\*35 a été largement décrit comme étant associé à une progression plus rapide de la maladie. C'est aussi un allèle qui est très représenté dans la population africaine notamment en Afrique de l'Ouest. Dans notre étude, 10 patients étaient porteurs de cet allèle, dont 4 étaient infectés par le sous-type recombinant CRF02\_AG.

La RT contient 3 épitopes possédant un IC<sub>50</sub> < 50 nM et donc potentiellement très présentables par la molécule HLA-B\*35:01 (**Tableau 14**). L'épitope RT(107-115) semble particulièrement conservé puisque que dans notre population, 10/10 patients possédaient un épitope identique à l'épitope HxB2 (TVLDVGDAY). Il est par ailleurs inscrit de la « A-list » et figure donc parmi les épitopes CTL les mieux définis pour le VIH-1. RT(107-115) est donc un très bon candidat pour la conception d'un vaccin.

**Tableau 14 - Épitopes restreints par le HLA-B\*35:01 présentant un IC50 < 50 nM**

Souche	Sous type	Position (Hxb2)	RT(107-115)	RT(156-164)			RT(175-183)		
		Epitope	TVLDVGDAY	SPAIFQSSM	SPAIFQCSM	SPAIFQASM	NPDIVIQY	NPDIIYQY/ NPD <sub>L</sub> VIYQY	NPEIVIQY
		IC <sub>50</sub>	21,8 nM	43,5 nM	42,8 nM	33,9 nM	42,9 nM	41,3 / 44 nM	80 nM
HxB2	B		1	1			1		
4833	B		1					1	
5448	B		1		1			1	
6206	B		1		1	1	1		
5274	B		1	1		1	1		
6460	B		1				1		
5520	O2AG		1	1		1		1	
5742	O2AG		1	1		1		1	
4805	O2AG		1			1		1	
5341	O2AG		1			1		1	

RT(156-164), déjà identifié pour l'allèle B\*07:02, semble également être reconnu par la molécule HLA-B\*35:01. Bien qu'il ne soit pas dans la « A-list », il est décrit dans la base de données de Los Alamos comme épitope CTL présentable par la molécule HLA-B\*35:01. Il affiche à nouveau un polymorphisme de séquence au niveau du résidu 162 (SPAIFQSSM) qui n'affecte pas la capacité de présentation du peptide. En effet, les 3 formes de l'épitope présentes dans les différentes séquences de nos patients ont toutes un IC<sub>50</sub> < 50 nM. Enfin, l'épitope RT(175-183) est lui retrouvé sous 4 formes. Deux variants présentent une mutation en position 4 de l'épitope qui n'affecte pas du tout l'affinité du peptide pour la molécule HLA, le troisième variant possède un acide glutamique (E) à la place d'un acide aspartique (D) au niveau du 3<sup>ème</sup> aa, ce qui induit une légère augmentation de l'IC<sub>50</sub> qui reste < 500 nM. A noter que les 4 sous-types recombinant CRF02\_AG présentent tous un variant identique de l'épitope de référence HxB2 aussi bien pour RT(156-164) et RT(175-183). Cet épitope est par ailleurs inscrit dans la « A-list ». Les trois épitopes sont donc théoriquement très bien présentables par le HLA-B\*35:01 malgré la variabilité de RT(156-164) et RT(175-183) et pourraient être retenus pour la conception d'un vaccin thérapeutique.

La RT contient par ailleurs, 3 épitopes avec un IC<sub>50</sub> pour la molécule HLA-B\*35:01 compris entre 50 nM et 500 nM (**Tableau 15**). Le premier, RT(116\_124) est retrouvé identique à l'épitope HxB2 seulement chez 5 patients sur 9. Un variant est en effet retrouvé chez les 4 autres patients, tandis qu'un patient possède une double population virale et donc à la fois la forme sauvage et la forme mutée. Ce variant, est caractérisé par le remplacement d'un acide glutamique (E) par un acide aspartique (D) en position 8 de l'épitope. Il n'est théoriquement plus reconnu par la molécule HLA puisque son IC<sub>50</sub> passe à 1104,6 nM. L'épitope RT(224-232) est quant à lui retrouvé identique à l'épitope de référence HxB2 chez les neuf patients, indépendamment du sous-type viral et semble donc très conservé.

Enfin, le troisième : RT(246-254) possède un variant avec une mutation en position 3 (remplacement d'un acide glutamique (E) par un acide aspartique (D)) qui est retrouvé chez un patient seulement. Cette mutation a cette fois-ci un impact positif sur la présentation de l'épitope et entraîne une diminution de l'IC<sub>50</sub> de 456,6 à 284,8 nM.

**Tableau 15 - Épitopes restreints par le HLA-B\*35:01 présentant un IC<sub>50</sub> < 500 nM**

Position	Peptide	Taille (aa)	IC <sub>50</sub> (nM)	Fréquence	Los Alamos
RT(116-124)	FSVPLDKEF	9	247,2	5/9	Non
	FSVPLDKDF	9	1104,6	5/9	
RT(224-232)	EPPFLWMGY	9	249,8	9/9	Non
RT(246-254)	LPEKDSWTV	9	456,6	6/7*	Non
	LPDKDSWTV	9	284,8	1/7*	(RT(242-252) : Oui)

\* Séquençage incomplet

Légende : voir **Tableau 10**

### 3.1.5 Épitopes restreints au HLA-B\*15:01

Seuls 7 patients sur les 8 possédant l'allèle HLA-B\*15:01 ont bénéficié d'un séquençage du gène de la RT. L'analyse de ces séquences a permis d'identifier de nombreux épitopes théoriquement capables d'être reconnus par HLA-B\*15:01. Deux épitopes voisins présentaient un IC<sub>50</sub> inférieur à 50 et sont présentés dans le **Tableau 16**.

**Tableau 16 - Épitopes restreints par le HLA-B\*15:01 présentant un IC<sub>50</sub> < 50 nM**

Souche	Sous type	Position (Hxb2)	RT(163-171)		RT(162-171)			
		Epitope	SMTKILEPF	SMTRILEPF	SSMTKILEPF	SSMTRILEPF	ASMTKILEPF GSMTKILEPF	CSMTKILEPF
		IC <sub>50</sub>	24,8 nM	33,1 nM	36,3 nM	33,2 nM	36,7/66 nM	67,2 nM
HxB2	B		1		1			
443	B		1		1			
5272	B		1		1			
4071	B		1		1			1
5180	B		1	1	1	1		
6214	B		1		1		1/1	1
1374	C		1		1			
5630	Indeter		1		1			

Il s'agit d'une part de RT(163-171) qui est retrouvé identique à l'épitope de référence HxB2 chez tous les patients de l'étude. Un des patients possède également une deuxième population virale comportant un variant muté de l'épitope en position 4 mais qui reste théoriquement très bien reconnu par la molécule HLA-B\*15:01. Le second, RT(162-171) qui présente un aa supplémentaire par rapport à son homologue RT(163-171) est également théoriquement très bien présenté par HLA-B\*15:01 puisque peu importe le variant retrouvé chez les patients étudiés, l'IC<sub>50</sub> affiche toujours une valeur traduisant une reconnaissance très forte de l'épitope. En effet, les mutations observées en position 1 du peptide ne semble pas affecter son affinité pour la molécule HLA. A noter qu'un des patients possède 4 versions différentes de l'épitope. Enfin, de façon intéressante, cet épitope est inscrit dans la base de données de Los Alamos en tant qu'épitope CTL présentable par HLA-B\*15:01.

Si nous considérons ensuite les peptides dont l'IC<sub>50</sub> est compris entre 50 nM et 500 nM, onze autres épitopes peuvent être identifiés (**Tableau 17**). Parmi eux, quatre (RT(33-41), RT(172-181), RT(173-181) et RT(160-168)) ne peuvent être retenus pour la composition d'un vaccin peptidique puisque certains patients possèdent des variants de l'épitope de référence HxB2 qui ne sont théoriquement plus du tout reconnus par HLA-B\*15:01 comme le témoignent leurs IC<sub>50</sub> très élevés (exemple : le variant de ALTAICEDM de l'épitope RT(33-41) possède un IC<sub>50</sub> égal à 2881,2 nM). A noter que RT(173-181) est décrit comme épitope CTL dans la base de données de Los Alamos. A l'inverse, les sept autres (RT(47-56), RT(106-115), RT(107-115), RT(107-115), RT(179-188), RT(181-188) et RT(221-230)) sont tous des candidats potentiels pour un vaccin puisque très conservés dans les séquences analysées. Des tests fonctionnels seront cependant nécessaires puisqu'aucun d'entre eux n'a encore été décrit dans la littérature comme épitope présentable par HLA-B\*15:01. L'épitope RT(107-115) et les deux autres épitopes voisins RT(106-115) et (107-116) sont particulièrement intéressants du fait que le peptide TVLDVGDAY qu'ils contiennent est également théoriquement bien présentable par la molécule HLA-B\*35:01.

**Tableau 17 - Épitopes restreints par le HLA-B\*15:01 présentant un IC50 < 500 nM**

Position	Peptide	Taille (aa)	IC <sub>50</sub> (nM)	Fréquence	Los Alamos
RT(33-41)	ALVEICTEM	9	171,1	3/7	
	ALIEICTEM	9	117,5	1/7	
	ALLIEICTEM	9	<b>556,7</b>	1/7	Non
	ALTEICTEM	9	<b>712,6</b>	1/7	
	ALTAICEDM	9	<b>2881,2</b>	1/7	
RT(47-56)	ISKIGPENPY	10	280,6	7/7	Non
RT(106-115)	VTVLVDVGDAY	10	143,9	6/7	Non
	ITVLVDVGDAY	10	194,9	1/7	
RT(107-115)	TVLVDVGDAY	9	489,8	7/7	Non
RT(107-116)	TVLVDVGDAYF	10	395,4	7/7	Non
RT(160-168)	FQSSMTKIL	9	192,5	7/7	
	FQSSMTRIL	9	105,6	1/7	
	FQASMTKIL	9	126,2	1/7	Non
	FQCSMTKIL	9	324,7	2/7	
	FQGSMTKIL	9	<b>673,6</b>	1/7	
RT(172-181)	RKQNPDIVIY	10	82,4	2/7	
	RKQNPEI <sup>II</sup> IY	10	72,9	1/7	
	RAKNPEI <sup>IV</sup> IY	10	129,4	1/7	
	RKQNPDM <sup>VI</sup> IY	10	106,8	1/7	Non
	RIKNPEI <sup>IV</sup> IY	10	115,7	1/7	
	RKHNPDIVIY	10	<b>1315,9</b>	1/7	
	RKHNPPEI <sup>II</sup> IY	10	<b>1472</b>	1/7	
RT(173-181)	KQNPDIVIY	9	45,4	2/7	
	KQNPEI <sup>III</sup> IY	9	42,1	1/7	
	AKNPEI <sup>IV</sup> IY	9	<b>1485,4</b>	1/7	
	KQNPDM <sup>VI</sup> IY	9	63,8	1/7	Oui
	IKNPEI <sup>IV</sup> IY	9	<b>1662,4</b>	1/7	
	KHNPDIVIY	9	<b>5478,1</b>	1/7	
	KHNPEI <sup>II</sup> IY	9	<b>5866,1</b>	1/7	
RT(179-188)	VIIYQYMDLDY	10	444,4	6/7	Non
	I <sup>II</sup> IYQYMDLDY	10	353,6	1/7	
RT(181-188)	YQYMDLDY	8	404,2	7/7	Non
RT(221-230)	HQKEPPFLWM	10	298,8	7/7	Non

Légende : voir **Tableau 10**

### 3.1.6 Épitopes restreints au HLA-B\*18:01

L'analyse des séquences n'a pas permis d'identifier d'épitopes possédant un IC<sub>50</sub> < 50 nM mais deux épitopes possédant un IC<sub>50</sub> < 500 nM ont pu être caractérisés (**Tableau 18**). Le premier, WEVQLGIPH est situé en position RT(88-96). Il semble situé dans une région très conservée puisque l'ensemble des

séquences étudiées possédaient un épitope identique à l'épitope de référence HxB2. Bien que supérieur à 50 nM, son IC<sub>50</sub> égal à 83,9 nM prédit une bonne présentation théorique aux CTL. Par contre, il n'est pas recensé dans la base de données de Los Alamos : son immunogénicité devra donc être prouvée expérimentalement avant son utilisation dans un éventuel vaccin. Le second, RT(137-146), est par contre bien caractérisé comme présentable par HLA-B\*18:01 dans la littérature (voir « A-list »). Dans la population de l'étude, il est majoritairement retrouvé avec une séquence identique à celle d'HxB2. Seul un patient possède un variant avec une mutation au niveau du 6<sup>ème</sup> acide aminé (Isoleucine (I) remplacé par un Alanine (A)) mais les conséquences de cette mutation semblent minimales pour sa présentation, puisque l'IC<sub>50</sub> passe de 95,4 à 156,2 nM et reste donc inférieur à 500 nM.

**Tableau 18 - Épitopes restreints par le HLA-B\*18:01 présentant un IC<sub>50</sub> < 500 nM**

Position	Peptide	Taille (aa)	IC <sub>50</sub> (nM)	Fréquence	Los Alamos
RT(88-96)	WEVQLGIPH	9	83,9	5/5	Non
RT(137-146)	NETPGIRYQY	10	95,4	4/5	Oui
	NETPGARYQY	10	156,2	1/5	Oui

Légende : voir **Tableau 10**

### 3.1.7 Épitopes restreints au HLA-B\*51:01

L'allèle HLA-B\*51:01 est très représenté chez les patients de l'étude puisque 12 d'entre eux en sont porteurs. De façon très surprenante, nous n'avons pu identifier aucun peptide possédant un IC<sub>50</sub> < 50 ni même < 500 nM, au sein de la RT. Ceci coïncide assez bien avec le fait que de manière générale, l'allèle HLA-B\*51 est connu pour avoir un répertoire T peu diversifié. Par ailleurs, la valeur moyenne des IC<sub>50</sub> théoriques des peptides (issus du VIH-1 ou non) potentiellement présentables par cet allèle est supérieure à celle des autres allèles. Il se pourrait donc que la molécule HLA-B\*51 soit capable de présenter des peptides avec un IC<sub>50</sub> bien supérieur à 500 nM. En effet, la « A-list » contient deux épitopes contenus au sein de la RT et présentables par HLA-B\*51:01. Le premier TAFTIPSI situé en position RT(128-135), est retrouvé muté au niveau de la position 8 du peptide chez la plupart des patients de l'étude (**Tableau 19**). Comme décrit dans la littérature, ces variants présentent une affinité plus faible pour la molécule HLA-B\*51:01 et seront donc moins bien présentés voire non reconnus par celle-ci. Le présence du second (RT(293-301)) n'a pas pu être investiguée car cet épitope est situé à l'extrémité du gène de la RT dans une zone non séquencée dans le cadre des génotypages ADN car non décrit pour contenir des mutations de résistance.



**Tableau 19 - Épitope RT(128-135) chez les patients HLA-B\*51:01**

Souche	Sous type	Position (Hxb2)	RT(128-135)					
		Epitope	TAFTIPSI	TAFTIPSV	TAFTIPSL TAFTIPSM	TAFTIPST	TAFTIPSK	TAFTIPSR
		IC <sub>50</sub>	5316,3 nM	8899,9 nM	13916,6 nM 17991,1 nM	34981,5 nM	39166,4 nM	39576,7 nM
HxB2	B		1					
659	B		1					
6306	B		1	1				
731	B				1			
376	B					1		
4837	B					1		
4890	B					1		
5247	B					1		
6587	B					1		
1399	B						1	1
4583	CRF_06						1	1
1374	C					1		
5012	F1				1			

### 3.1.8 Épitopes restreints au HLA-B\*53:01

Bien que très fréquent dans la population africaine, HLA\*B\*53:01 est un allèle que l'on retrouve très peu dans la population caucasienne. Dans notre population seuls trois patients possédaient cet allèle et tous étaient infectés par un sous-types non-B.

Deux épitopes potentiels présentant un IC<sub>50</sub> < 500 nM ont pu être identifiés au sein de la RT (**Tableau 20**). Il s'agit de RT(235-244) et RT(246-254) qui se situent tous les deux à l'extrémité du gène codant la RT. Cependant pour des raisons analytiques, cette région du gène est souvent difficile à séquencer dans le cadre de génotypages de résistance. De ce fait, les séquences nucléotidiques de cette région n'ont pu être obtenues que pour un patient sur les trois, qui était infecté par un sous-type CRF02\_AG. L'épitope RT(246-254) retrouvé chez ce patient diffère de l'épitope de référence HxB2 par une mutation au niveau de son 3<sup>ème</sup> acide aminé (remplacement de l'acide glutamique (E) par un acide aspartique (D)). Cette mutation n'impacte pas la reconnaissance de l'épitope par la molécule HLA puisque qu'au contraire l'IC<sub>50</sub> égal est abaissé de 84,5 pour l'épitope de référence à 52,7 nM pour le variant. Le second, RT(235-244) est lui retrouvé sous deux formes chez ce patient : HPDKWTVQSI identique à l'épitope de référence et HPDKWTVQPI qui diffère d'un aa en 9<sup>ème</sup> position et qui de la même façon que pour RT(246-254), ne semble théoriquement pas impacter la reconnaissance par HLA-B\*53:01 puisque l'IC<sub>50</sub> reste relativement stable. Cependant, il faudrait un plus grand échantillonnage

pour confirmer qu'il n'existe pas d'autres variants porteurs de mutation impactant la reconnaissance de l'épitope.

**Tableau 20 - Épitopes restreints par le HLA-B\*53:01 présentant un IC<sub>50</sub> < 500 nM**

Position	Peptide	Taille (aa)	IC <sub>50</sub> (nM)	Fréquence	Los Alamos
<b>RT(246-254)</b>	<b>LPEKDSWTV</b>	9	84,5	0/1	Non
	L <u>P</u> DKDSWTV	9	52,7	1/1*	Non
<b>RT(235-244)</b>	<b>HPDKWTVQSI</b>	10	428,2	1/1*	Non
	HPDKWTVQ <u>P</u> I	10	455,8	1/1*	Non

\* Séquence obtenue uniquement pour 1/3 patients possédant l'allèle HLA-B\*53:01

*Légende : voir **Tableau 10***

### 3.2 Analyse de l'INT

L'analyse des séquences codant pour l'INT nous a permis d'identifier un nombre beaucoup moins important d'épitopes potentiellement présentables par les différentes molécules HLA-B étudiées. Ces observations concordent avec ce qui est décrit dans la littérature comme en témoigne le peu d'épitopes caractérisés pour les HLA-B sélectionnés pour cette étude dans la « A-list ».

Dans un premier temps, nous avons investigué la présence d'épitopes présentant un  $IC_{50} < 50$  mM dans les séquences codant l'INT de nos patients. Les résultats sont résumés dans le **Tableau 21**. Seuls 4 épitopes restreints au HLA-B\*15:01 présentaient une liaison théorique de forte affinité pour la molécule HLA. Parmi eux, 3 (INT(173-181), INT(176-185) INT(177-185)) sont retrouvés chez 100% des patients avec une séquence identique à HxB2. Ces 3 épitopes constituent donc des candidats potentiels pour le cocktail vaccinal sous réserve d'une confirmation *in vitro* de leur capacité à induire une réponse CTL puisqu'aucun d'entre eux n'est répertorié dans la base de données des épitopes CTL de Los Alamos. Le 4<sup>ème</sup>, INT(215-223), est retrouvé muté au niveau des 2 premiers aa chez un des patients de l'étude. Cette double mutation entraîne une diminution drastique de l'affinité théorique du peptide pour la molécule HLA-B\*15:01 puisque l' $IC_{50}$  passe de 33,8 à 10 037,2 nM et donc empêche plus que probablement la reconnaissance du peptide.

**Tableau 21 – Epitopes conservés identifiés au sein de l'intégrase possédant un  $IC_{50} < 50$  mM**

	Position	Peptide	Taille (aa)	$IC_{50}$ (nM)	Fréquence	Los Alamos
B*07:02						
B*08:01						
B*35:01						
B*44:02						
B*44:03						
B*15:01	INT(173-181)	<b>KTAVQMAVF</b>	9	48,9	6/6	Non
	INT(176-185)	<b>VQMAVFIHNF</b>	10	15,7	6/6	Non
	INT(177-185)	<b>QMAVFIHNF</b>	9	36,7	6/6	Non
	INT(215-223)	<b>KQITKIQNF</b>	9	33,8	5/6	Non
		<b>NNILKIQNF</b>	9	<b>10037,2</b>	1/6	Non
B*18:01						
B*51:01						
B*53:01						

Légende : voir **Tableau 10**

L'analyse des peptides possédant un  $IC_{50}$  compris entre 50 mM et 500 nM nous a par contre, permis d'identifier des épitopes reconnus par tous les HLA-B sélectionnés à l'exception des HLA-B\*18:01, 51:01 et 53:01. Les peptides identifiés sont présentés dans le **Tableau 22**.

**Tableau 22 - Epitopes conservés identifiés au sein de l'intégrase possédant un IC<sub>50</sub> < 500 nM**

	Position	Peptide	Taille (aa)	IC <sub>50</sub> (nM)	Fréquence	Los Alamos
B*07:02	INT(260-268)	VPRRKAKII	9	53,6	7/9	Non
		I <sup>u</sup> PRRKAKII	9	51,1	1/9	
		VPRRKVKII	9	74,3	1/9	
B*08:01	INT(260-268)	VPRRKAKII	9	168,8	4/5	Non
		VPRRKVKII	9	109,8	1/5	
	INT(101-110)	LLKLAGRWPV	10	458,1	1/5	
		I <sup>u</sup> LKLAGRWPV	10	849,6	4/5	Non
B*35:01	INT(75-83)	VAVHVASGY	9	91,4	7/7	Non
B*44:02	INT(91-100)	AETGQETAYF	10	77,3	7/7	Non
		AETGQETA <sup>u</sup> L <sup>u</sup> F	10	60,8	1/7	
		AETGK <sup>u</sup> D <sup>u</sup> TAYF	10	116,6	1/7	
	INT(95-104)	QETAYFL <sup>u</sup> L <sup>u</sup> KL	10	256,4	2/7	
		QETA <sup>u</sup> L <sup>u</sup> F <sup>u</sup> I <sup>u</sup> L <sup>u</sup> KL	10	212,7	1/7	
		QETAYF <sup>u</sup> I <sup>u</sup> L <sup>u</sup> KL	10	226,1	3/7	
		K <sup>u</sup> D <sup>u</sup> TAYF <sup>u</sup> I <sup>u</sup> L <sup>u</sup> KL	10	13405,4	1/7	
B*44:03	INT(91-100)	AETGQETAYF	10	111,5	9/10	Non
		E <sup>u</sup> ETGQETAYF	10	552,8	1/10	
	INT(95-104)	QETAYFL <sup>u</sup> L <sup>u</sup> KL	10	264,6	4/10	
		QETAYF <sup>u</sup> I <sup>u</sup> L <sup>u</sup> KL	10	223,7	6/10	Non
B*15:01	INT(74-83)	LVAVHVASGY	9	50,4	6/6	Non
	INT(75-83)	VAVHVASGY	9	120,9	6/6	Non
	INT(134-143)	GIKQEF <sup>u</sup> GIPY	10	98,4	4/6	Non
		GI <sup>u</sup> Q <sup>u</sup> EF <sup>u</sup> GIPY	10	52,6	1/6	(Int(135-143) : oui)
		N <sup>u</sup> V <sup>u</sup> T <sup>u</sup> Q <sup>u</sup> EF <sup>u</sup> GIPY	10	573,9	1/6	
	INT(172-181)	LKTAVQ <sup>u</sup> MAV <sup>u</sup> F	10	93,4	6/6	Non
	INT(217-226)	ITKI <sup>u</sup> Q <sup>u</sup> FRVY	9	111,7	5/6	Non
		I <sup>u</sup> L <sup>u</sup> KI <sup>u</sup> Q <sup>u</sup> FRVY	9	35	1/6	
INT(214-223)	QKQITKI <sup>u</sup> Q <sup>u</sup> NF	10	160,7	5/6	Non	
	QNNILKI <sup>u</sup> Q <sup>u</sup> NF	10	8893,5	1/6		
INT(219-227)	KIQNFRVYY	9	362,9	6/6	Non	
B*18:01						
B*51:01						
B*53:01						

Légende : voir **Tableau 10**

Au total, nous avons identifié 5 épitopes hautement conservés dont la séquence ne présentait pas de variation par rapport à l'épitope de référence HXB2, et dont 4 étaient présentables par le HLA-B\*15:01. Nous avons également identifié 5 épitopes qui présentent des variants théoriquement toujours reconnus par la molécule HLA-B concernée et enfin 5 épitopes dont les variants présentent des mutations qui empêchent théoriquement la reconnaissance par la molécule HLA-B. Aucun d'entre eux n'était décrit dans la base de données de Los Alamos.

### 3.3 Analyse de la PR

La même approche a été utilisée pour l'identification d'épitopes au sein de la PR. Seul 1 épitope (voir **Tableau 23**) restreint par le HLA-B\*15:01 présentait une liaison théorique de forte affinité ( $IC_{50} < 50$  mM). Cet épitope est un très bon candidat pour le vaccin multi-épitopique puisqu'en plus d'être retrouvé sous sa forme sauvage chez tous les patients de l'étude possédant un allèle HLA-B\*15:01, il est documenté dans la base de données de Los Alamos comme inducteur d'une réponse CTL via la molécule HLA-B\*15:01.

**Tableau 23 - Epitopes conservés identifiés au sein de la protéase possédant un  $IC_{50} < 50$  mM**

	Position	Peptide	Taille (aa)	$IC_{50}$ (nM)	Fréquence	Los Alamos
B*07:02						
B*08:01						
B*35:01						
B*44:02						
B*44:03						
B*15:01	PR(45-53)	<b>KMIGGIGGF</b>	9	13,3	6/6	Oui
B*18:01						
B*51:01						
B*53:01						

Légende : voir **Tableau 10**

Concernant les épitopes présentant un  $IC_{50}$  compris entre 50 mM et 500 nM, comme pour l'INT, nous avons identifié des épitopes reconnus par tous les HLA-B sélectionnés à l'exception des HLA-B\*18:01, 51:01 et 53:01. Les résultats sont résumés dans le **Tableau 24**. Au total, nous avons identifié 4 épitopes hautement conservés qui ne sont pas répertoriés au sein de la base de données de Los Alamos et 3 épitopes qui présentent des variants théoriquement toujours reconnus par la molécule HLA-B concernée. Nous avons également identifié 8 épitopes dont les variants présentent des mutations qui empêchent théoriquement la reconnaissance par la molécule HLA-B. A noter, que comparé aux autres protéines, le nombre de variants identifiés pour chaque peptide est plus important, notamment pour l'épitope PR(24-42) pour qui nous retrouvons 55 mutants différents présents chez les différents patients. La majorité des variants étaient présents chez un même patient. Bien que cela n'a pas pu être fait, il aurait fallu confirmer ces données par un nouveau séquençage ou une analyse par Next Generation Sequencing (NGS).

**Tableau 24 - Epitopes conservés identifiés au sein de la protéase possédant un IC<sub>50</sub> < 500 nM**

	Position	Peptide	Taille (aa)	IC <sub>50</sub> (nM)	Fréquence	Los Alamos
B*07:02	PR(38-46)	<b>LPGRWKPKM</b>	9	347,8	6/10	Non*
		LPGKWKPKM	9	480,7	4/10	
		LPGR*KPKM	9	<b>Codon stop</b>	1/10	
	PR(43-50)	<b>KPKMIGGI</b>	8	458,5	10/10	Non
	PR(43-51)	<b>KPKMIGGIG</b>	9	274,5	10/10	Non
	PR(55-63)	<b>KVRQYDQIL</b>	9	399,8	3/10	Non
		KVRQYDQVL	9	151,3	1/10	
		KVRQYDQIP	9	<b>26916</b>	2/10	
		KVKQYDQIL	9	<b>2801.3</b>	1/10	
		KVRQYDQIS	9	<b>16687,1</b>	1/10	
		KVKQYDQIA	9	<b>16809,6</b>	1/10	
		KVRQYEQVP	9	<b>22783,1</b>	1/10	
		KVKQYDQIP	9	<b>37189,9</b>	1/10	
	PR(80-89)	<b>TPVNIIGRNL</b>	10	255,3	8/10	Oui
TPVNIIGRNM		10	448,1	1/10		
TPVNIIGRNM		10	<b>501,7</b>	1/10		
TPVNIIGRNL		10	<b>1151,6</b>	1/10		
B*08:01	PR(53-62)	<b>FIKVRQYDQI</b>	10	93,1	6/9	Non
		FIKVKQYDQI	10	166,3	3/9	
		FIKVRQYDQV	10	169,5	1/9	
B*35:01						
B*44:02	PR(33-42)	<b>LEEMSLPGRW</b>	10	27,9	1/10	Non
		17 mutants différents	10	25,9-183,6	9/10	
	PR(34-42)	<b>EEMSLPGRW</b>	10	10,2	1/10	Oui (A list)
		17 mutants différents	10	<b>9,4-1419</b>	9/10	
B*44:03	PR(33-42)	<b>LEEMSLPGRW</b>	10	45,4	1/11	Non
		55 mutants différents	10	26-214,4	11/11	
	PR(34-42)	<b>EEMSLPGRW</b>	10	13,2	1/11	Oui (A list)
		55 mutants différents	10	<b>8-2351,4</b>	11/11	
B*15:01	PR(35-42)	<b>EMSLPGRW</b>	10	320,7	1/11	Non
		55 mutants différents	10	<b>152-18417</b>	11/11	
	PR(44-53)	<b>PKMIGGIGGF</b>	10	155,4	6/6	Non
		<b>KMIGGIGGFI</b>	10	325,8	6/6	
		<b>RQYDQILIEI</b>	10	397	1/6	
		RQYEQVPIEI	10	497,8	1/6	
		RQYEEITIEI	10	<b>511,4</b>	1/6	
	PR(57-66)	RQYDQIPIEI	10	<b>569,7</b>	3/9	Non
RQYEEIIIIEI		10	<b>767,5</b>	1/6		
<b>LLTQIGCTL</b>		9	451,5	0/6		
PR(89-97)	LLTQLGCTL	9	409,7	6/6	Non	
	MLTQLGCTL	9	217,4	1/6		
B*18:01						
B*51:01						
B*53:01						

\* PR(38-47) reconnu par HLA-B\*07:01

Légende : voir **Tableau 10**

#### 4. Analyse globale et sélection des peptides vaccinaux

Cette étude nous a donc permis l'identification de 74 épitopes théoriquement présentables dans leur forme sauvage (Hxb2) par les 9 allèles B sélectionnés : 12 avec un  $IC_{50} < 50$  nM et 62 avec un  $IC_{50} < 500$  nM (données récapitulées dans le **Tableau 25**). Une séquence différente (mutée) de la séquence HxB2 a été retrouvée chez au moins un patient pour 47 d'entre eux (63,5 %) et une perte d'affinité de l'épitope pour la molécule HLA a été observée dans 25 cas sur les 47 (53,2 %). A noter que 6 épitopes décrits dans la base de données de Los Alamos comme présentables par la molécule HLA-B étudiée ont été retrouvés mutés et théoriquement non reconnus chez nos patients.

**Tableau 25 - Récapitulatifs des épitopes identifiés dans l'étude**

	Epitopes conservés	Epitopes avec variants théoriquement reconnus par la molécule HLA-B	Epitopes avec variants théoriquement non reconnus par la molécule HLA-B	Total
$IC_{50} < 50$ nM (Los Alamos*)	6 (3)	5 (4)	1(0)	12
$IC_{50} < 500$ nM (Los Alamos*)	21 (1)	17 (2)	24 (6)	62
<b>Total</b>	<b>27</b>	<b>22</b>	25	74

\* Epitopes décrits dans la base de données de Los Alamos comme présentables par la molécule HLA-B concernée

Nous avons notamment pu identifier 6 épitopes conservés possédant un  $IC_{50} < 50$  nM, dont 3 appartenant à la base de données des épitopes CTL de Los Alamos. Nous avons également caractérisé 5 épitopes possédant un  $IC_{50} < 50$  nM dont les variants sont théoriquement toujours reconnus par la molécule HLA-B. Parmi eux, 4 sont décrits dans la base de données de Los Alamos.

La compilation de ces données nous a conduit à la sélection de 10 peptides épitopiques qui pourront entrer dans la composition d'un cocktail vaccinal peptidique, associés à d'autres. Ces peptides pourront être reconnus par les molécules HLA-B 35:01, 15:01, 07:02, 18:01 et 08:01 (**Figure 19**). De façon intéressante, 3 d'entre eux sont théoriquement présentables par deux molécules HLA-B à la fois. Pour 4 peptides (identifiés en gris sur la figure), il sera nécessaire de confirmer expérimentalement la reconnaissance par la molécule HLA-B correspondante. En effet, bien que décrite pour d'autres molécules HLA, leur association avec le HLA-B identifié dans notre étude n'a jamais été décrite dans la littérature.

A noter qu'aucun peptide conservé et correctement présentable n'a pu être identifié pour les haplotypes B\*51:01, B\*53:01, B\*44:01 et B\*44:03.

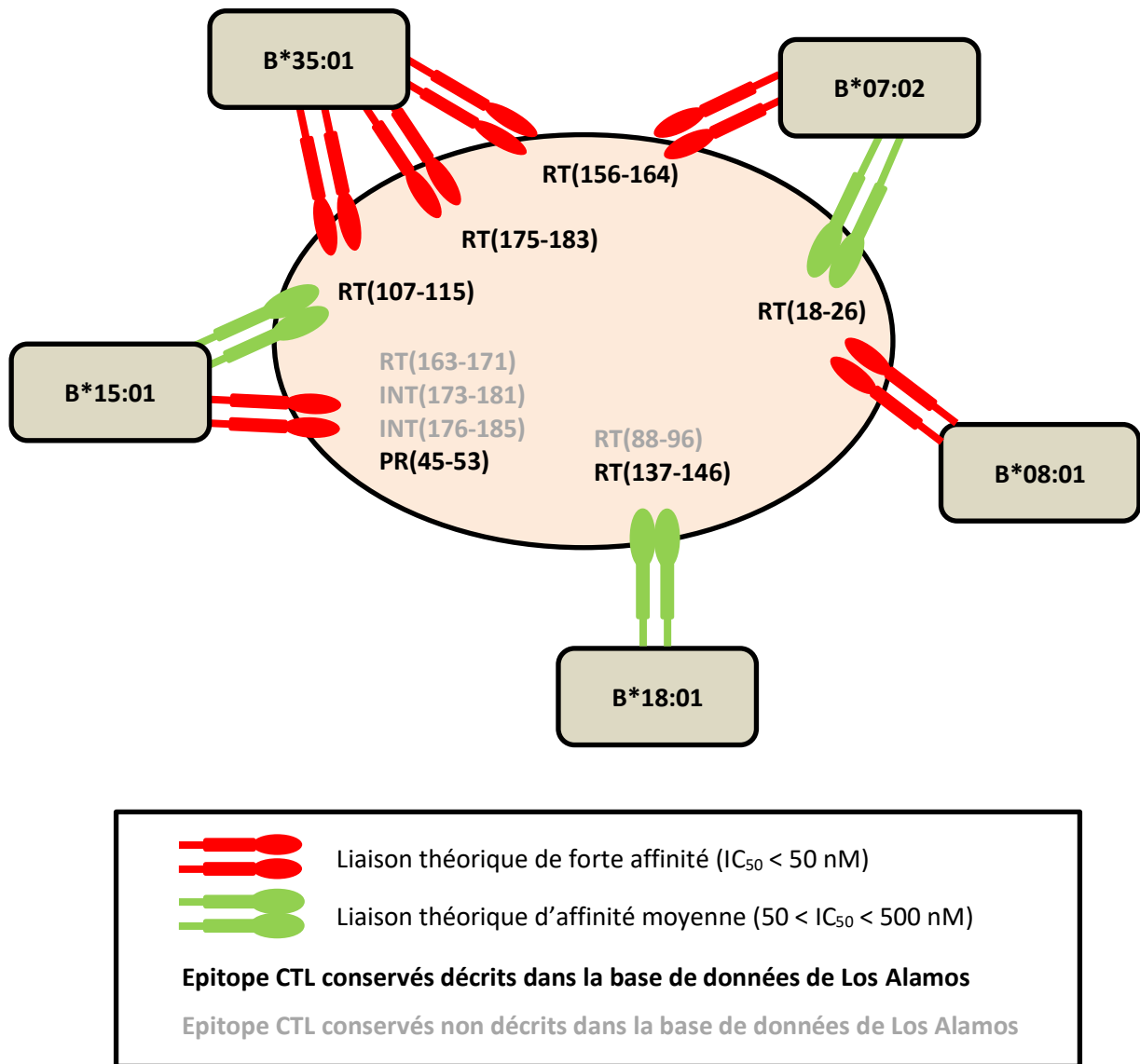


Figure 19 - Peptides retenus pour la composition du cocktail vaccinal thérapeutique en fonction des allèles B



## 5. Visualisation 3D des peptides épitopiques

Nous nous sommes ensuite intéressés à la localisation des peptides sélectionnés au sein de la RT. Brièvement, la RT du VIH-1 est un hétérodimère composé de deux sous-unités : la p51 qui joue un rôle structural et la p66, plus grande, qui correspond à l'unité fonctionnelle de l'enzyme. Cette sous-unité p66 est constituée de 3 domaines dont le domaine polymérase qui s'étend du codon 1 au codon 311. La structure cristallographique de ce domaine évoque une main droite constituée de sous-domaines dénommés :

- « Les doigts » impliqué dans le contact avec le brin matrice
- « La paume » contenant le site catalytique de polymérisation et le motif primer grip (aa 229-232) impliqué dans le positionnement du complexe ARN/ADN (amorce/matrice)
- « Le pouce » intervenant dans la fixation du complexe ARN/ADN<sup>138</sup>

A l'aide du logiciel gratuit de visualisation moléculaire PyMOL, nous avons placé les épitopes conservés sélectionnés pour le cocktail vaccinal au sein de la molécule de RT (**Figure 20**). La molécule de RT est colorée en vert et les épitopes conservés en rose. De façon intéressante, on constate qu'ils se situent tous dans la partie droite de la RT qui correspond au « pouce » de la main droite.

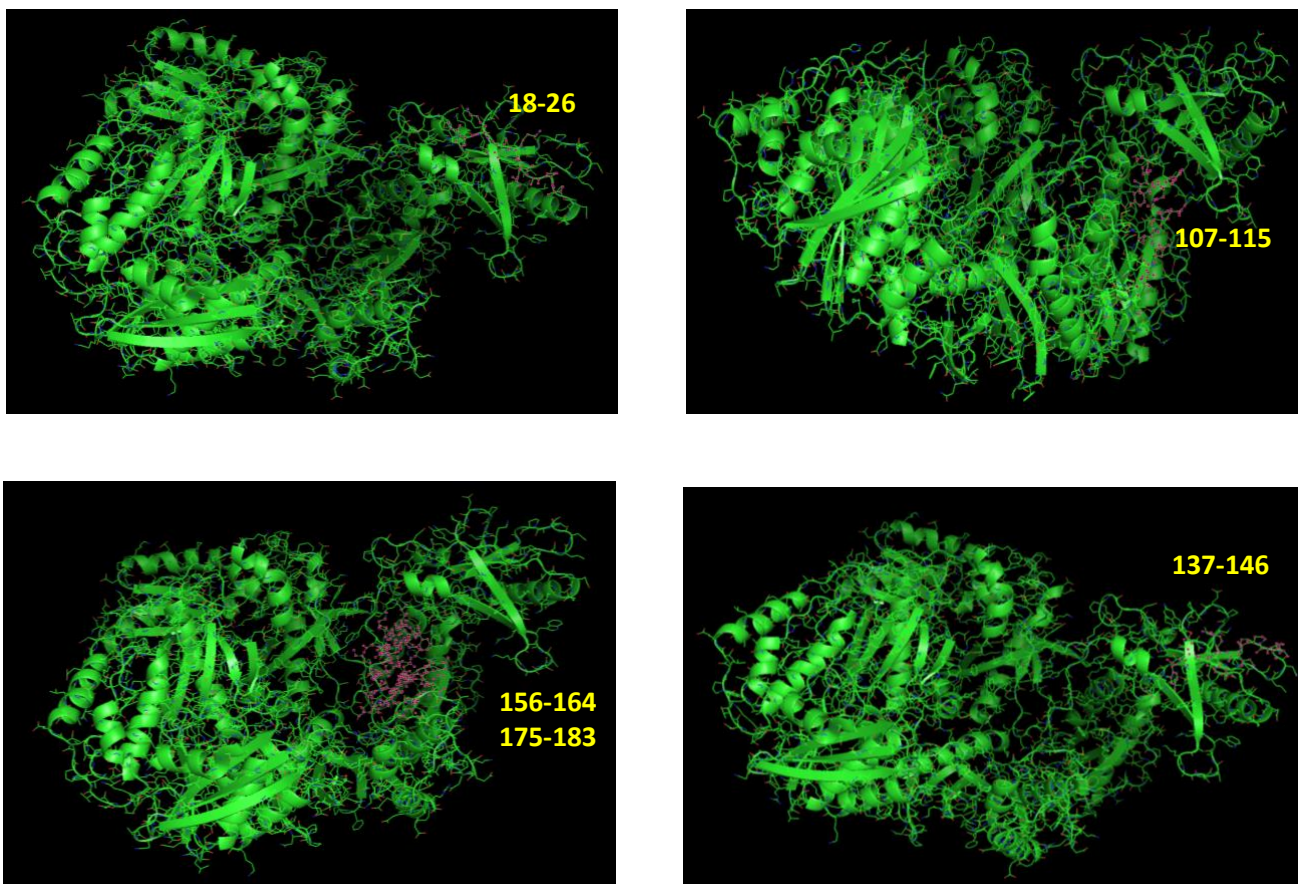


Figure réalisée avec le logiciel PyMOL

## DISCUSSION

Plusieurs études ont démontré l'importance de la réponse CTL dans le contrôle du VIH-1. Pour cette raison, la recherche vaccinale anti-VIH s'intéresse depuis quelques années à l'élaboration de vaccins capables d'induire une réponse CTL dirigée contre le virus. Cette stratégie est particulièrement intéressante dans le cadre de la vaccination thérapeutique, qui s'adresse à des patients déjà infectés par le VIH-1. En effet, elle pourrait permettre de maîtriser la réplication virale qui émerge des réservoirs viraux à l'arrêt du TAR, voire même d'éradiquer le virus dans le cadre de stratégies « Shock and Kill ». Cependant, la capacité du virus à muter pour échapper au système immunitaire, associée à la diversité génétique du VIH-1 constitue un véritable challenge pour la conception de ce type de vaccin. Dans ce cadre, nous nous sommes intéressés dans ce travail, à la caractérisation d'épitopes conservés au sein de l'ADN archivé et présentables par le HLA-B, de patients infectés par le VIH-1 suivis au CHU de Bordeaux.

L'échappement du VIH-1 à la réponse cytotoxique des CTL est bien documenté<sup>121,139-141</sup>. Des mutations d'échappement aux CTL sont acquises très rapidement après la primo-infection<sup>142</sup> et sont ensuite retrouvées chez plus de 98 % des provirus contenus dans les réservoirs viraux<sup>2</sup>. Certaines études suggèrent même que l'apparition de ces mutations d'échappement serait un des facteurs prépondérant de la diversité génétique des séquences observées chez les patients infectés par le VIH-1 et contribuerait à l'évolution du virus<sup>143</sup>. En effet, elles seraient sélectionnées par la pression qu'exercent les CTL spécifiques sur les épitopes sauvages<sup>144</sup> et pourraient expliquer la progression virale malgré une réponse CTL puissante mais finalement insuffisante pour l'éradication virale. Elles pourraient également en partie expliquer le succès minime observé de la cinquantaine d'essais cliniques réalisés au des cours des 20 dernières années dans le domaine des vaccins thérapeutiques anti-VIH-1<sup>145</sup>. Pour cause, la plupart de ces vaccins sont désignés à partir de séquences issues du virus sauvage de référence HxB2 et ne tiennent pas compte de la présence de ces mutants d'échappement. C'est pourquoi notre approche propose d'analyser la variabilité du virus isolé chez des patients en succès thérapeutique, après archivage au sein de l'ADN proviral.

Des études préliminaires réalisées dans le cadre de Provir ont étudié la variabilité des épitopes viraux dans les différents compartiments d'un même patient. Bien qu'à priori minoritaires, des différences ont été observées entre l'ARN viral plasmatique circulant et l'ADN proviral archivé au sein des cellules mononuclées du sang périphérique (PBMC)<sup>1</sup>. Il se pourrait donc que des mutants d'échappement soient sélectionnés et archivés au cours de la phase de réduction de la CV après l'initiation du TAR ou au cours de la réplication résiduelle à bas niveau qui persisterait chez les patients contrôlés<sup>146</sup>. Des

travaux sont actuellement en cours pour étudier la variabilité des épitopes CTL dans le réservoir du GALT à partir de biopsies digestives. Le rebond viral observé à l'arrêt du TAR chez les PvVIH provenant vraisemblablement de cet ADN proviral archivé, il apparaît capital de tenir compte de la variabilité des épitopes viraux contenus dans les réservoirs latents.

Nous avons fait le choix de nous intéresser uniquement aux patients qui possédaient au moins un allèle HLA-B parmi les plus fréquents dans la population africaine et caucasienne. En effet, une des contraintes majeures quant à l'utilisation de peptides pour l'élaboration de vaccins visant à stimuler les CTL est la capacité de ces peptides à se lier aux molécules polymorphes du CMH de classe I. Cependant, au vu de la diversité du système HLA dans la population et du fait de contraintes de production et rentabilité, l'élaboration de vaccins personnalisés, en fonction du système HLA de chacun, est pour l'instant irréalisable. 9 allèles B sur les 90 différents représentés dans la cohorte initiale de patients ont été choisis. Ils permettent de couvrir 57,4 % de la cohorte. Ce choix paraît donc tout à fait pertinent, au moins pour la population de PvVIH suivie au CHU de Bordeaux. De plus, l'existence de supertypes partageant des caractéristiques structurales et fonctionnelles leur permettant de reconnaître des motifs peptidiques semblables pourrait augmenter la portée du vaccin multi-épitopique. En effet, par exemple les patients porteurs de l'allèle B\*07:03 reconnaîtront possiblement les épitopes identifiés pour l'allèle B\*07:02 appartenant au même supertype. Cette hypothèse devra bien-sûr faire l'objet de nouvelles investigations pour confirmation.

Nous avons ensuite décidé de nous focaliser sur des patients en succès virologique, n'ayant jamais répliqué sous TAR. En effet, ces patients représentent la population cible pour les tentatives de guérison virale. Ce critère a conduit à l'exclusion d'un grand nombre de patients. Ceci s'explique en partie par le fait qu'avant 2010, du fait d'effets indésirables lourds et contraignants, et d'une absence de preuves scientifiques suffisantes le contre-indiquant, il était courant d'arrêter le TAR chez les patients asymptomatiques possédant des CD4 > 500 mm<sup>3</sup>. L'inobservance, des résistances au TAR ou encore la survenue de *blips* permettent également d'expliquer le grand nombre de patients qui avaient répliqué sous traitement. Exclue dans cette première étude, il pourra être intéressant d'étudier la variabilité des épitopes CTL chez les patients ayant répliqué sous traitement afin de déterminer si des mutations de résistance aux TAR croisent avec des mutations d'échappement aux CTL.

Nous avons donc finalement analysé les séquences d'ADN proviral archivé de 53 patients infectés par le VIH-1 n'ayant jamais répliqué sous traitement et possédant au moins un allèle HLA-B parmi les plus fréquents dans les populations caucasienne et africaine. La majorité des patients était des hommes (71,7 %) et l'âge médian était de 49,9 ans. Ces chiffres coïncident exactement avec ceux des personnes suivies pour une infection par le VIH en France en 2015 (68,3 % d'hommes, âge médian de 49,7 ans)

publiés dans le dernier rapport d'experts de recommandations pour la prise en charge du VIH ([https://cns.sante.fr/wp-content/uploads/2017/10/experts-vih\\_epidemiolo.pdf](https://cns.sante.fr/wp-content/uploads/2017/10/experts-vih_epidemiolo.pdf)). La majorité des patients étaient infectés par un sous-type B (69,8 %) ce qui concorde globalement avec les différentes études épidémiologiques réalisées en France ces dernières années, même si ce pourcentage est légèrement plus élevé dans notre cohorte<sup>147</sup>. Plus de la moitié des patients avaient été mis sous TAR dans l'année qui a suivi le diagnostic, tandis que l'initiation du TAR avait été différée jusqu'à 10 ans après la découverte de la séropositivité chez d'autres. Cette disparité s'explique par l'évolution des recommandations sur les critères d'introduction des antirétroviraux notamment chez les patients asymptomatiques. De la même façon, le délai entre la mise en place du traitement et la réalisation du génotypage qui a permis d'obtenir les séquences ADN du virus était très variable selon les patients. Cette homogénéité entre les patients était finalement un atout pour cette étude puisqu'elle nous a permis d'étudier la variabilité des épitopes CTL dans de multiples situations cliniques, en conditions réelles. Il serait intéressant d'évaluer l'impact de ces facteurs sur la variabilité des épitopes à partir d'une cohorte plus importante. Il aurait également été intéressant d'avoir la date exacte de contamination des patients, même si celle-ci est régulièrement méconnue du patient lui-même. En effet Deng et al. ont récemment montré que les mutations d'échappement aux CTL sont rares chez les patients traités en primo-infection (< 3 mois après la contamination), alors que près de 100% des séquences codant pour *gag* des patients traités après la primo-infection hébergeaient des mutations d'échappement aux CTL<sup>2</sup>.

L'analyse de ces séquences a permis de confirmer l'importante variabilité des épitopes CTL au sein de l'ADN proviral. En effet, 63,5 % des épitopes identifiés au sein des séquences isolées chez les patients de l'étude présentaient des mutations par rapport à la séquence de référence HxB2. Dans la moitié des cas, l'affinité théorique du peptide pour la molécule HLA était conservée. Bien que ces résultats ne soient que théoriques, ils s'expliquent d'une part par la capacité du TCR des lymphocytes T CD8+ à reconnaître différents variants d'un même épitope, en particulier si les mutations surviennent dans des positions non cruciales pour l'épitope, et d'autre part, par la capacité des molécules du CMH à reconnaître des peptides différents mais qui présentent une longueur correcte et des résidus d'ancrages identiques ou semblables. Dans l'autre moitié des cas, l'IC<sub>50</sub> calculé pour au moins un des variants isolé indiquait une perte de reconnaissance par la molécule HLA. Ces variants peuvent notamment correspondre à des mutants d'échappement aux CTL sélectionnés par le virus pour éviter d'être reconnus ou présentés par les CTL. Dans ce cas, les mutations surviennent au niveau des résidus d'ancrage ou au niveau des résidus qui interagissent avec le TCR<sup>148</sup>. Une base de données qui recense les variants d'échappement aux CTL décrits dans la littérature est disponible sur le site internet de Los Alamos ([https://www.hiv.lanl.gov/content/immunology/variants/ctl\\_variant.html](https://www.hiv.lanl.gov/content/immunology/variants/ctl_variant.html)). Cependant, la majorité des variants que nous avons identifiés n'y figurent pas. Plusieurs hypothèses sont possibles.

La première est que nous avons identifié de nouveaux variants d'échappement, jamais décrits. Cette hypothèse devra cependant être validée sur une plus large cohorte ainsi que par des tests complémentaires *in vitro*. Une autre hypothèse est que ces variants contiennent des mutations qui sont apparues indépendamment de la pression de sélection exercée par les CTL. Elles peuvent en effet être simplement associées à un sous type viral. Elles peuvent également correspondre à des mutations de résistances aux TAR ou encore, être générées par l'APOBEC3 comme observé chez certains des patients de l'étude possédant les allèles HLA-B\*44:02 et HLA-B\*44:03. A noter qu'il a été démontré que le VIH-1 pouvait tirer partie des mutations non létales induites par APOBEC3 pour générer des variants d'échappement aux CTL<sup>149</sup>. Quoiqu'il en soit, notre étude montre qu'il est indispensable de tenir compte de l'ensemble des variants, quelle que soit leur origine pour la conception d'un vaccin efficace.

Ce travail nous a par ailleurs permis d'identifier 27 épitopes hautement conservés dont 6 possédant un  $IC_{50} < 50$  nM ainsi que 22 épitopes dont les variants sont théoriquement toujours reconnus par la molécule HLA-B, dont 5 possédant un  $IC_{50} < 50$  nM. Ce sont donc potentiellement 49 épitopes qui présentent un intérêt pour la conception d'un vaccin peptidique. L'interprétation de ces résultats doit cependant rester prudente. Seuls 10 de ces épitopes sont recensés dans la base de données de Los Alamos et ont donc été rapportés dans la littérature comme capable d'induire une réponse CTL efficace. Par conséquent, Il est indispensable de confirmer l'immunogénicité des épitopes théoriques par le biais de tests fonctionnels *in vitro* type IFN- $\gamma$  ELISpot (*Enzyme-Linked ImmunoSpot*) qui permettent d'évaluer la réponse T. En effet, ces résultats ont été obtenus à partir de logiciels de prédictions qui calculent l'affinité d'une molécule HLA pour un peptide donné. Pour chaque peptide, sont pris en compte : son accessibilité au clivage par le protéasome, la nature biochimique de ses résidus, sa capacité à se fixer sur les protéines TAP et ses résidus d'ancrage définis pour chacune des molécules HLA<sup>150</sup>. Cependant, la capacité d'un épitope à induire une réponse cytotoxique et notamment la production de cytokines par les lymphocytes ne dépend pas uniquement de son affinité pour la molécule du CMH-I. Elle dépendrait également de l'avidité du TCR pour le complexe CMH-I/épitope/ $\beta$ 2m. Ainsi, des CTL qui possède une forte avidité pour le complexe CMH-I/épitope/ $\beta$ 2m produiraient davantage de cytokines et induiraient plus rapidement la mort des cellules infectées<sup>151,152</sup>. Cependant, du fait de la plasticité du TCR, ce facteur est certainement moins important à prendre en compte. En effet, des études cristallographiques ont montré que chaque TCR ne reconnaît en fait qu'un à trois résidus du peptide associé au CMH<sup>153</sup>, ce qui confère aux lymphocytes T CD8+ une capacité à reconnaître différents variants d'un même épitope. Par ailleurs, d'autres études ont montré que des mutations au sein des séquences avoisinant l'épitope pouvaient également influencer son « *processing* » et sa présentation par les molécules du CMH-I, jusqu'à abolir la réponse CTL<sup>154,155</sup>. Enfin, ces logiciels ne tiennent pas compte d'autres facteurs importants tels que le type de cellules impliqués

dans la présentation ou encore la quantité de protéine dégradée. Pour toutes ces raisons, dans un premier temps, seront retenus pour la composition du cocktail vaccinal thérapeutique, les épitopes qui présentent une forte affinité pour les molécules HLA de classe I ( $IC_{50} < 50$  nM) et préférentiellement ceux qui ont été décrits dans la littérature comme induisant une réponse CTL.

Au final, nous avons donc sélectionné 10 peptides qui pourront être reconnus par les molécules HLA-B\*35:01, 15:01, 07:02, 18:01 et 08:01. Ces peptides seront associés à d'autres dans le but d'augmenter le potentiel immunogène du vaccin d'une part, et d'autre part d'élargir la population ciblée. Une étude à plus grande échelle est actuellement en cours dans le cadre du projet Provir/Latitude 45. Cette étude réalisée sur des patients recrutés à Bordeaux, Rio de Janeiro (Brésil) et Montréal (Canada), s'intéresse également à l'identification d'épitopes CTL dans l'ADN proviral de patients en succès thérapeutique mais en prenant en compte à la fois le HLA-A et le HLA-B des patients. En combinant Sanger/NGS comme méthodes de séquençage, l'analyse s'étend aussi à d'autres protéines du VIH dont notamment *gag* et *nef* qui sont connues pour contenir la densité la plus élevée d'épitopes CTL<sup>156</sup>. L'analyse des premiers résultats de cette étude à grande échelle concorde avec les résultats de ce travail, bien que l'abord de séquençage soit différent. En effet, dans ce travail de thèse, nous avons utilisé les séquences nucléotidiques obtenues à l'issue des génotypages de résistance réalisés en routine chez les patients par méthode Sanger. Ce type de méthode, largement utilisée en France dans le cadre des génotypages de résistance, ne permet la détection que des variants avec une prévalence d'environ 20%<sup>157</sup>. De nombreuses études comparatives réalisées sur les mutations de résistances aux antirétroviraux ont permis de montrer que la meilleure sensibilité du NGS permet d'augmenter significativement la détection des mutations minoritaires<sup>158,159</sup>. La présence de ces mutations minoritaires a clairement été associée à un risque d'échec pour les INNTI<sup>160</sup> mais reste controversée pour les autres classes thérapeutiques<sup>161</sup>. Cependant, peu de données sont disponibles concernant l'apport du NGS dans la détection de mutations d'échappement aux CTL. Une étude réalisée sur les épitopes CTL présents chez *gag* et *pol* montre une concordance entre les deux méthodes supérieure à 90%<sup>134</sup>. Seule une infime partie des variants minoritaires était théoriquement non reconnue par les CTL dans cette étude. Nous ne pouvons donc exclure que d'autres variants épitopiques non détectés par méthode Sanger dans cette étude puissent être identifiés par NGS.

Nous avons ensuite utilisé le logiciel de visualisation moléculaire PyMol (<http://www.pymol.org>) afin de localiser les régions comportant les épitopes conservés identifiés. Nous nous sommes focalisés uniquement sur les épitopes sélectionnés au sein de la RT du fait de leur majorité. De façon intéressante, ils se situent tous au niveau du « pouce » du domaine polymérase ce qui suggère que peu de mutations ont été sélectionnées dans cette zone. En effet, malgré l'extrême plasticité du protéome du VIH-1, la variabilité du virus n'est pas illimitée. Certains domaines, du fait d'exigences

structurelles et fonctionnelles, possèdent une variabilité très limitée voire nulle<sup>162</sup>. Il existe pour le virus une balance entre maintien de ces capacités répliquatives (*fitness*) et mutation du génome pour échapper à la réponse immunitaire. Seules les mutations avantageuses pour le virus seront sélectionnées. De façon, intéressante, il a été montré que les allèles B\*57/58:01, associés à une progression lente de la maladie, reconnaissent des épitopes extrêmement conservés dont tout échappement survient au prix d'une altération drastique de la capacité répliquative du virus<sup>163</sup>. Dans notre étude, nous n'avons pas sélectionné les patients porteurs des allèles HLA-B\*57 et HLA-B\*27 qui sont les allèles les plus décrits comme étant associés à une progression lente vers le stade SIDA. Nous ne pouvons donc rechercher une éventuelle association avec la présence plus importante d'épitopes conservés chez ces patients. Cependant, nous avons sélectionné les allèles HLA-B\*35:01 et B\*08:01 qui ont été largement décrits comme associés à une évolution plus rapide de la maladie<sup>119</sup>. En émettant l'hypothèse que des mutations d'échappement seraient à l'origine de cette progression accélérée, on aurait pu s'attendre à identifier un nombre limité d'épitopes ou en tout cas, un nombre limité d'épitopes conservés. Etonnamment, à l'inverse, nous avons identifié chez les patients porteurs de ces allèles, un grand nombre d'épitopes hautement conservés ou dont les variants sont théoriquement toujours reconnus par la molécule HLA. Il a été montré que les épitopes CTL restreints aux allèles HLA de classe I associés à une progression lente de la maladie possèdent une meilleure reconnaissance croisée de certains de leur variants épitopiques par rapport aux allèles associés à une progression normale ou accélérée de la maladie<sup>164</sup>. Il se pourrait donc qu'au-delà des molécules HLA de classe I, ce soient les épitopes qui possèdent une meilleure reconnaissance croisée de leur variants par la molécule HLA qui seraient associés à une progression lente de la maladie. Une reconnaissance plus efficace des variants pourrait en effet limiter l'échappement viral et contribuer à un contrôle continu de la réplication chez les *controllers*.

## CONCLUSION & PERSPECTIVES

Dans cette étude, nous confirmons l'importante variabilité des épitopes CTL au sein de l'ADN proviral archivé. Nous montrons également que les mutations à l'origine de cette variabilité peuvent diminuer l'affinité théorique de ces épitopes pour la molécule HLA-B et empêcher leur présentation. En admettant que les virus archivés sous forme d'ADN proviral sont à l'origine de la réplication virale émergente à l'échec ou à l'interruption du TAR, ces résultats montrent que la mise au point d'un vaccin efficace doit inévitablement tenir compte de la variabilité des épitopes CTL dans les réservoirs viraux et de leur présentation par les molécules HLA de classe I. Dans cette optique, nous avons identifié des épitopes présentables par les allèles HLA-B les plus fréquents dans la population caucasienne et africaine, hautement conservés, ou dont la variabilité n'affecte pas l'affinité pour la molécule HLA-B.

Cette étude s'intègre dans une étude plus large, pour l'instant théorique, mais qui ouvre des perspectives sur un cocktail polypeptidique vaccinal thérapeutique destiné à promouvoir la réponse CTL existante chez des patients déjà infectés par le VIH-1. Chez des patients en succès thérapeutique, un tel type de vaccin pourrait permettre de contrôler durablement la réplication du virus après interruption du traitement et donc éviter le rebond viral généralement observé. On pourrait alors parler de guérison fonctionnelle ou encore de vacance thérapeutique. Combiné avec d'autres stratégies permettant de diminuer le niveau du réservoir viral, il pourrait conduire à l'éradication complète du virus et permettre d'atteindre le graal thérapeutique : la guérison virologique.

Le cocktail vaccinal est aujourd'hui proche de sa définition et va maintenant mériter d'arriver à l'étape d'immunologie fonctionnelle et d'injection expérimentale à des primates afin de prouver son efficacité.



## ANNEXES

### ANNEXE 1 – Extrait de la liste des épitopes CTL les mieux définis « A-list »

Epitope	Protéine	HxB2 localisation	Protéine	Sous-type	HLA
<a href="#">EEMNLPGRW</a>	<i>pol</i>	90-98	PR(34-42)		B44
<a href="#">GKKAIGTVL</a>	<i>pol</i>	124-132	PR(68-76)		B*15:03
<a href="#">GPKVKQWPL</a>	<i>pol</i>	173-181	RT(18-26)	B	B*08:01
<a href="#">TVLDVGDAY</a>	<i>pol</i>	262-270	RT(107-115)		B*35:01
<a href="#">VPLDEDFRKY</a>	<i>pol</i>	273-282	RT(118-127)		B*35:01
<a href="#">TAFTIPSI</a>	<i>pol</i>	283-290	RT(128-135)		B*51:01
<a href="#">NETPGIRYQY</a>	<i>pol</i>	292-301	RT(137-146)		B18
<a href="#">SPAIFQSSM</a>	<i>pol</i>	311-319	RT(156-164)		B7
<a href="#">NPEIVYQY</a>	<i>pol</i>	330-338	RT(175-183)		B18
<a href="#">HPDIVYQY</a>	<i>pol</i>	330-338	RT(175-183)	B	B*35:01
<a href="#">LVGKLNWASQIY</a>	<i>pol</i>	415-426	RT(260-271)		B*15:01
<a href="#">YPGIKVRQL</a>	<i>pol</i>	426-434	RT(271-279)	B	B*42:01
<a href="#">IPLTEEAEL</a>	<i>pol</i>	448-456	RT(293-301)		B*3501, B*5101
<a href="#">ILKEPVHGVY</a>	<i>pol</i>	464-473	RT(309-318)	B	B*1501, Cw*1202
<a href="#">VTDSQYALGI</a>	<i>pol</i>	651-660	RT(496-505)		B*1503
<a href="#">LPPIVAKEI</a>	<i>pol</i>	743-751	INT(28-36)		B*4201
<a href="#">IQQEFGIPIY</a>	<i>pol</i>	850-858	INT(135-143)		B*1503
<a href="#">FKRKGIGGY</a>	<i>pol</i>	900-909	INT(185-194)		B*1503
<a href="#">VPRRKAKII</a>	<i>pol</i>	975-983	INT(260-268)		B42
<a href="#">RKAKIIRDY</a>	<i>pol</i>	978-986	INT(263-271)		B*1503

## ANNEXE 2 – Caractéristiques des patients de l'étude

Nom de la séquence	Sous type	Charge Virale plasmatique (copies/ml)	HLA-B allèle 1	HLA-B allèle 2	Année du diagnostic	Année du début du TAR	Délai entre le diagnostic et le début du TAR (année)	Nombre d'année sous TAR	Gènes séquencés
HxB2	B								
5630	indéterminé	<50	B*15:01	B*15:01	2002	2002	<1	12	RT, INT
5272	B	<50	B*15:01	B*18:01	1998	1998	<1	15	RT, INT, PR
5278	B	<50	B*44:02	B*49:01	2003	2003	<1	14	RT, INT, PR
4551	CRF01_B	<50	B*35:03	B*53:01	2011	2011	<1	2	RT, INT, PR
4553	B	<50	B*44:02	B*40:01	2011	2011	<1	4	RT, INT, PR
5219	B	<50	B*44:02	B*44:03	2013	2013	<1	4	RT, INT, PR
1374	C	<50	B*15:01	B*51:01	2007	2007	<1	9	RT, INT, PR
0659	B	<50	B*44:02	B*51:01	2006	2006	<1	10	RT, PR
5934	B	<50	B*14:02	B*44:02	2012	2012	<1	3	RT, INT, PR
5341	CRF02_AG	<50	B*35:01	B*44:03	2013	2013	<1	4	RT, INT, PR
4728	B	<50	B*07:02	B*14:02	2012	2012	<1	3	RT, INT, PR
4833	B	<50	B*35:01	B*55:01	2012	2012	<1	4	RT
5742	CRF02_AG	<50	B*35:01	B*35:01	2014	2014	<1	2	RT, INT, PR
5247	B	<50	B*49:01	B*51:01	2005	2005	<1	8	RT, INT, PR
6277	CRF02_AG	<50	B*08:01	B*44:02	2015	2015	<1	1	RT, PR
4508	CRF45_cpx	<50	B*53:01	B*58:01	2009	2009	<1	1	RT, PR
6469	B	<50	B*07:02	B*44:03	2016	2016	<1	1	RT, INT, PR
5520	CRF02_AG	<50	B*35:01	B*35:01	2001	2001	<1	15	RT, INT, PR
6306	B	<50	B*08:01	B*51:01	2016	2016	<1	1	RT, INT, PR
5070	B	<50	B*35:02	B*44:03	2007	2007	<1	6	RT, PR
5679	CRF02_AG	<50	B*07:02	B*18:01	2014	2014	<1	1	RT, INT, PR
4463	CRF02_AG	<50	B*53:01	B*58:02	2011	2011	<1	2	RT, PR
5180	B	<50	B*15:01	B*55:01	2011	2011	<1	2	RT, PR
6508	G	<50	B*08:01	B*81	2014	2014	<1	2	RT, INT, PR
5560	B	<50	B*15:01	B*51:01	2014	2014	<1	3	INT
5142	CRF02_AG	<50	B*08:01	B*44:02	2009	2010	1	3	RT, PR

Nom de la séquence	Sous type	Charge Virale plasmatique (copies/ml)	HLA-B allèle 1	HLA-B allèle 2	Année du diagnostic	Année du début du TAR	Délai entre le diagnostic et le début du TAR (année)	Nombre d'année sous TAR	Gènes séquencés
6460	B	<50	B*35:01	B*44:03	2003	2004	1	12	RT, INT, PR
4071	B	<50	B*07:02	B*15:01	2009	2010	1	2	RT, PR
6137	B	<50	B*44:02	B*55:01	1998	1999	1	16	RT, INT, PR
1826	B	<50	B*18:01	B*44:03	2007	2008	1	2	RT, INT, PR
4852	B	<50	B*38:01	B*44:02	2009	2010	1	2	RT, INT, PR
5722	B	<50	B*44:03	B*14:02	2009	2010	1	6	RT, INT, PR
6587	B	<50	B*44:03	B*51:01	2014	2015	1	1	RT, INT, PR
0731	B	<50	B*51:01	B*51:01	2005	2007	2	9	RT, INT, PR
4837	B	<50	B*38:01	B*51:01	2010	2012	2	5	RT, INT, PR
4583	CRF_06	<50	B*44:03	B*51:01	2011	2013	2	3	RT, INT, PR
0443	B	<50	B*15:01	B*18:01	2001	2004	3	12	RT, INT, PR
5164	B	<50	B*44:02	B*44:03	2009	2012	3	1	RT, INT, PR
2078	B	<50	B*07:02	B*35:03	2006	2009	3	7	RT, INT, PR
6206	B	<50	B*18:01	B*35:01	2008	2012	4	3	RT, INT, PR
5012	F1	<50	B*51:01	B*57:01	2009	2013	4	4	RT, INT, PR
5274	B	<50	B*27:05	B*35:01	1990	1995	5	18	RT, INT, PR
5448	B	<50	B*35:01	B*37:01	1991	1997	6	16	RT, PR
1399	B	<50	B*08:01	B*51:01	2000	2007	7	9	RT, INT, PR
6214	B	<50	B*07:02	B*15:01	1995	2003	8	13	RT, INT, PR
5578	B	<50	B*07:02	B*27:05	1988	1996	8	18	RT, INT, PR
4890	B	<50	B*08:01	B*51:01	2002	2011	9	1	RT, RT
0376	B	<50	B*08:01	B*51:01	1995	2005	1<1	11	RT, INT, PR
6384	B	<50	B*08:01	B*44:03	1984	2004	2<1	12	RT, INT, PR
4805	CRF02_AG	<50	B*35:01	B*57:03	2009	INCONNU	Controler	Controler	RT, INT, PR
5179	G	<50	B*07:02	B*08:01	2002	INCONNU	INCONNU	INCONNU	RT, INT, PR
5097	B	<50	B*07:02	B*46:01	INCONNU	2008	INCONNU	5	RT, INT, PR
1488	B	<50	B*07:02	B*58:01	INCONNU	2000	Inconnu	12	RT, INT, PR

### **ANNEXE 3 - Liste d'abréviations des acides aminés**

**A** = Alanine

**C** = Cystéine

**D** = Acide aspartique

**E** = Acide glutamique

**F** = Phenylalanine

**G** = Glycine

**H** = Histidine

**I** = Isoleucine

**K** = Lysine

**L** = Leucine

**M** = Methionine

**N** = Asparagine

**P** = Proline

**Q** = Glutamine

**R** = Arginine

**S** = Serine

**T** = Threonine

**V** = Valine

**W** = Tryptophane

**Y** = Tyrosine

## BIBLIOGRAPHIE

1. Papuchon, J. *et al.* Resistance mutations and CTL epitopes in archived HIV-1 DNA of patients on antiviral treatment: toward a new concept of vaccine. *PloS One* **8**, e69029 (2013).
2. Deng, K. *et al.* Broad CTL response is required to clear latent HIV-1 due to dominance of escape mutations. *Nature* **517**, 381–385 (2015).
3. Gartland, A. J. *et al.* Analysis of HLA A\*02 Association with Vaccine Efficacy in the RV144 HIV-1 Vaccine Trial. *J. Virol.* **88**, 8242–8255 (2014).
4. Centers for Disease Control (CDC). Pneumocystis pneumonia--Los Angeles. *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.* **30**, 250–252 (1981).
5. Barré-Sinoussi, F. *et al.* Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* **220**, 868–871 (1983).
6. Clavel, F. *et al.* Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS. *Science* **233**, 343–346 (1986).
7. Clavel, F. *et al.* Molecular cloning and polymorphism of the human immune deficiency virus type 2. *Nature* **324**, 691–695 (1986).
8. Van Heuverswyn, F. *et al.* Human immunodeficiency viruses: SIV infection in wild gorillas. *Nature* **444**, 164 (2006).
9. Keele, B. F. *et al.* Chimpanzee Reservoirs of Pandemic and Nonpandemic HIV-1. *Science* **313**, 523–526 (2006).
10. Worobey, M. *et al.* Direct evidence of extensive diversity of HIV-1 in Kinshasa by 1960. *Nature* **455**, 661–664 (2008).
11. Hirsch, V. M. *et al.* An African primate lentivirus (SIVsm) closely related to HIV-2. *Nature* **339**, 389–392 (1989).
12. Leoz, M. *et al.* Origine, diffusion et évolution des VIH-1 de groupe O. *Virologie* **21**, 27–38 (2017).
13. Taylor, B. S. *et al.* The Challenge of HIV-1 Subtype Diversity. *N. Engl. J. Med.* **358**, 1590–1602 (2008).
14. Villabona-Arenas, C. J. *et al.* HIV-1 group O infection in Cameroon from 2006 to 2013: Prevalence, genetic diversity, evolution and public health challenges. *Infect. Genet. Evol. J. Mol. Epidemiol. Evol. Genet. Infect. Dis.* **36**, 210–216 (2015).
15. Peeters, M. *et al.* Characterization of a highly replicative intergroup M/O human immunodeficiency virus type 1 recombinant isolated from a Cameroonian patient. *J. Virol.* **73**, 7368–7375 (1999).
16. Plantier, J.-C. *et al.* A new human immunodeficiency virus derived from gorillas. *Nat. Med.* **15**, 871–872 (2009).
17. Hemelaar, J. The origin and diversity of the HIV-1 pandemic. *Trends Mol. Med.* **18**, 182–192 (2012).
18. Santos, A. F. & Soares, M. A. HIV Genetic Diversity and Drug Resistance. *Viruses* **2**, 503–531 (2010).
19. Hemelaar, J. *et al.* Network for HIV Isolation and Characterisation. Global trends in molecular epidemiology of HIV-1 during 2000-2007. *AIDS Lond. Engl.* **25**, 679–689 (2011).
20. Chaix, M.-L. *et al.* Increasing HIV-1 Non-B Subtype Primary Infections in Patients in France and Effect of HIV Subtypes on Virological and Immunological Responses to cART. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* **56**, (2012).
21. Zhu, P. *et al.* Distribution and three-dimensional structure of AIDS virus envelope spikes. *Nature* **441**, 847–852 (2006).

22. Dalgleish, A. G. *et al.* The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus. *Nature* **312**, 763–767 (1984).
23. Alkhatib, G. *et al.* CC CKR5: a RANTES, MIP-1alpha, MIP-1beta receptor as a fusion cofactor for macrophage-tropic HIV-1. *Science* **272**, 1955–1958 (1996).
24. Deng, H. *et al.* Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1. *Nature* **381**, 661–666 (1996).
25. Feng, Y. *et al.* HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor. *Science* **272**, 872–877 (1996).
26. Fais, S. *et al.* Human Immunodeficiency Virus Type 1 Strains R5 and X4 Induce Different Pathogenic Effects in hu-PBL-SCID Mice, Depending on the State of Activation/Differentiation of Human Target Cells at the Time of Primary Infection. *J. Virol.* **73**, 6453–6459 (1999).
27. Connor, R. I. *et al.* Change in coreceptor use correlates with disease progression in HIV-1--infected individuals. *J. Exp. Med.* **185**, 621–628 (1997).
28. Samson, M. *et al.* Resistance to HIV-1 infection in caucasian individuals bearing mutant alleles of the CCR-5 chemokine receptor gene. *Nature* **382**, 722–725 (1996).
29. Craigie, R. The molecular biology of HIV integrase. *Future Virol.* **7**, 679–686 (2012).
30. Schröder, A. R. W. *et al.* HIV-1 integration in the human genome favors active genes and local hotspots. *Cell* **110**, 521–529 (2002).
31. Martin-Serrano, J. & Neil, S. J. D. Host factors involved in retroviral budding and release. *Nat. Rev. Microbiol.* **9**, 519–531 (2011).
32. Laskey, S. B. & Siliciano, R. F. A mechanistic theory to explain the efficacy of antiretroviral therapy. *Nat. Rev. Microbiol.* **12**, 772–780 (2014).
33. An, P. & Winkler, C. A. Host genes associated with HIV/AIDS: advances in gene discovery. *Trends Genet. TIG* **26**, 119–131 (2010).
34. Bacchus, 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* **8**, e64219 (2013).
35. Buchbinder, S. P. *et al.* Long-term HIV-1 infection without immunologic progression. *AIDS Lond. Engl.* **8**, 1123–1128 (1994).
36. Okulicz, J. F. *et al.* Clinical outcomes of elite controllers, viremic controllers, and long-term nonprogressors in the US Department of Defense HIV natural history study. *J. Infect. Dis.* **200**, 1714–1723 (2009).
37. Migueles, S. A. *et al.* HLA B\*5701 is highly associated with restriction of virus replication in a subgroup of HIV-infected long term nonprogressors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 2709–2714 (2000).
38. Cockerham, L. R. & Hatano, H. Elite control of HIV: is this the right model for a functional cure? *Trends Microbiol.* **23**, 71–75 (2015).
39. Betts, M. R. *et al.* HIV nonprogressors preferentially maintain highly functional HIV-specific CD8+ T cells. *Blood* **107**, 4781–4789 (2006).
40. Hersperger, A. R. *et al.* Perforin expression directly ex vivo by HIV-specific CD8 T-cells is a correlate of HIV elite control. *PLoS Pathog.* **6**, e1000917 (2010).
41. Martinez, V. & Autran, B. Les HIV controllers : Une nouvelle entité évolutive de l'infection par le VIH ? *médecine/sciences* **24**, 7–9 (2008).
42. Chun, T. W. *et al.* Re-emergence of HIV after stopping therapy. *Nature* **401**, 874–875 (1999).
43. Stöhr, W. *et al.* Duration of HIV-1 Viral Suppression on Cessation of Antiretroviral Therapy in Primary Infection Correlates with Time on Therapy. *PLOS ONE* **8**, e78287 (2013).

44. Henrich, T. J. *et al.* HIV-1 persistence following extremely early initiation of antiretroviral therapy (ART) during acute HIV-1 infection: An observational study. *PLoS Med.* **14**, e1002417 (2017).
45. Whitney, J. B. *et al.* Rapid Seeding of the Viral Reservoir Prior to SIV Viremia in Rhesus Monkeys. *Nature* **512**, 74–77 (2014).
46. Ananworanich, J. *et al.* Virological and immunological characteristics of HIV-infected individuals at the earliest stage of infection. *J. Virus Erad.* **2**, 43–48 (2016).
47. Hocqueloux, L. *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.* **68**, 1169–1178 (2013).
48. Nickle, D. C. *et al.* Evolutionary Indicators of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Reservoirs and Compartments. *J. Virol.* **77**, 5540–5546 (2003).
49. Finzi, D. *et al.* Latent infection of CD4+ T cells provides a mechanism for lifelong persistence of HIV-1, even in patients on effective combination therapy. *Nat. Med.* **5**, 512–517 (1999).
50. Avettand-Fènoël, V. *et al.* Total HIV-1 DNA, a Marker of Viral Reservoir Dynamics with Clinical Implications. *Clin. Microbiol. Rev.* **29**, 859–880 (2016).
51. Colin, L. & Van Lint, C. Molecular control of HIV-1 postintegration latency: implications for the development of new therapeutic strategies. *Retrovirology* **6**, 111 (2009).
52. Darcis, G. *et al.* HIV Latency: Should We Shock or Lock? *Trends Immunol.* **38**, 217–228 (2017).
53. Schwartz, C. *et al.* Un virus tapi dans l'ombre : les bases moléculaires de la latence du VIH-1 - Partie I : la physiologie de la latence du VIH-1. *médecine/sciences* **26**, 159–164 (2010).
54. Siliciano, J. D. *et al.* Long-term follow-up studies confirm the stability of the latent reservoir for HIV-1 in resting CD4+ T cells. *Nat. Med.* **9**, 727–728 (2003).
55. Mok, H. P. *et al.* No evidence of ongoing evolution in replication competent latent HIV-1 in a patient followed up for two years. *Sci. Rep.* **8**, 2639 (2018).
56. Lorenzo-Redondo, R. *et al.* Persistent HIV-1 replication maintains the tissue reservoir during therapy. *Nature* **530**, 51–56 (2016).
57. Van Zyl, G. U. *et al.* No evidence of HIV replication in children on antiretroviral therapy. *J. Clin. Invest.* **127**, 3827–3834 (2017).
58. Simonetti, F. R. *et al.* Clonally expanded CD4+ T cells can produce infectious HIV-1 in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **113**, 1883–1888 (2016).
59. Lee, G. Q. *et al.* Clonal expansion of genome-intact HIV-1 in functionally polarized Th1 CD4+ T cells. *J. Clin. Invest.* **127**, 2689–2696 (2017).
60. Bui, J. K. *et al.* Proviruses with identical sequences comprise a large fraction of the replication-competent HIV reservoir. *PLoS Pathog.* **13**, e1006283 (2017).
61. Hosmane, N. N. *et al.* Proliferation of latently infected CD4+T cells carrying replication-competent HIV-1: Potential role in latent reservoir dynamics. *J. Exp. Med.* **214**, 959–972 (2017).
62. Mullins, J. I. & Frenkel, L. M. Clonal Expansion of Human Immunodeficiency Virus–Infected Cells and Human Immunodeficiency Virus Persistence During Antiretroviral Therapy. *J. Infect. Dis.* **215**, S119–S127 (2017).
63. Ho, Y.-C. *et al.* Replication-competent noninduced proviruses in the latent reservoir increase barrier to HIV-1 cure. *Cell* **155**, 540–551 (2013).
64. Imamichi, H. *et al.* Defective HIV-1 proviruses produce novel protein-coding RNA species in HIV-infected patients on combination antiretroviral therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **113**, 8783–8788 (2016).
65. Van Damme, L. *et al.* Preexposure prophylaxis for HIV infection among African women. *N. Engl. J. Med.* **367**, 411–422 (2012).

66. Radzio, J. *et al.* The long-acting integrase inhibitor GSK744 protects macaques from repeated intravaginal SHIV challenge. *Sci. Transl. Med.* **7**, 270ra5 (2015).
67. Hütter, G. *et al.* Long-term control of HIV by CCR5 Delta32/Delta32 stem-cell transplantation. *N. Engl. J. Med.* **360**, 692–698 (2009).
68. Allers, K. *et al.* Evidence for the cure of HIV infection by CCR5Δ32/Δ32 stem cell transplantation. *Blood* **117**, 2791–2799 (2011).
69. Pham, H. T. & Mesplède, T. The latest evidence for possible HIV-1 curative strategies. *Drugs Context* **7**, (2018).
70. Zhu, W. *et al.* The CRISPR/Cas9 system inactivates latent HIV-1 proviral DNA. *Retrovirology* **12**, 22 (2015).
71. Tebas, P. *et al.* Gene Editing of CCR5 in Autologous CD4 T Cells of Persons Infected with HIV. *N. Engl. J. Med.* **370**, 901–910 (2014).
72. Yu, S. *et al.* Simultaneous Knockout of CXCR4 and CCR5 Genes in CD4+ T Cells via CRISPR/Cas9 Confers Resistance to Both X4- and R5-Tropic Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection. *Hum. Gene Ther.* **29**, 51–67 (2017).
73. Wilen, C. B. *et al.* Engineering HIV-resistant human CD4+ T cells with CXCR4-specific zinc-finger nucleases. *PLoS Pathog.* **7**, e1002020 (2011).
74. Liu, J. *et al.* Cell-penetrating peptide-mediated delivery of TALEN proteins via bioconjugation for genome engineering. *PLoS One* **9**, e85755 (2014).
75. Qu, X. *et al.* Zinc-finger-nucleases mediate specific and efficient excision of HIV-1 proviral DNA from infected and latently infected human T cells. *Nucleic Acids Res.* **41**, 7771–7782 (2013).
76. Ebina, H. *et al.* A high excision potential of TALENs for integrated DNA of HIV-based lentiviral vector. *PLoS One* **10**, e0120047 (2015).
77. Zhu, W. *et al.* The CRISPR/Cas9 system inactivates latent HIV-1 proviral DNA. *Retrovirology* **12**, 22 (2015).
78. Huang, Z. & Nair, M. A CRISPR/Cas9 guidance RNA screen platform for HIV provirus disruption and HIV/AIDS gene therapy in astrocytes. *Sci. Rep.* **7**, 5955 (2017).
79. Wang, Z. *et al.* CRISPR/Cas9-Derived Mutations Both Inhibit HIV-1 Replication and Accelerate Viral Escape. *Cell Rep.* **15**, 481–489 (2016).
80. Kim, Y. *et al.* Getting the “Kill” into “Shock and Kill”: Strategies to Eliminate Latent HIV. *Cell Host Microbe* **23**, 14–26 (2018).
81. Archin, N. M. *et al.* Administration of vorinostat disrupts HIV-1 latency in patients on antiretroviral therapy. *Nature* **487**, 482–485 (2012).
82. Søgaard, O. S. *et al.* The Depsipeptide Romidepsin Reverses HIV-1 Latency In Vivo. *PLoS Pathog.* **11**, e1005142 (2015).
83. Xing, S. *et al.* Disulfiram Reactivates Latent HIV-1 in a Bcl-2-Transduced Primary CD4+ T Cell Model without Inducing Global T Cell Activation. *J. Virol.* **85**, 6060–6064 (2011).
84. Rasmussen, T. A. & Lewin, S. R. Shocking HIV out of hiding: where are we with clinical trials of latency reversing agents? *Curr. Opin. HIV AIDS* **11**, 394–401 (2016).
85. Cummins, N. W. *et al.* Maintenance of the HIV Reservoir Is Antagonized by Selective BCL2 Inhibition. *J. Virol.* **91**, (2017).
86. Initiation of Antiretroviral Therapy in Early Asymptomatic HIV Infection. *N. Engl. J. Med.* **373**, 795–807 (2015).
87. TEMPRANO ANRS 12136 Study Group *et al.* A Trial of Early Antiretrovirals and Isoniazid Preventive Therapy in Africa. *N. Engl. J. Med.* **373**, 808–822 (2015).
88. Chéret, A. *et al.* Combined ART started during acute HIV infection protects central memory CD4+ T cells and can induce remission. *J. Antimicrob. Chemother.* **70**, 2108–2120 (2015).



89. Jain, V. *et al.* Antiretroviral therapy initiated within 6 months of HIV infection is associated with lower T-cell activation and smaller HIV reservoir size. *J. Infect. Dis.* **208**, 1202–1211 (2013).
90. Ananworanich, J. *et al.* HIV DNA Set Point is Rapidly Established in Acute HIV Infection and Dramatically Reduced by Early ART. *EBioMedicine* **11**, 68–72 (2016).
91. Mousseau, G. *et al.* An analog of the natural steroidal alkaloid cortistatin A potently suppresses Tat-dependent HIV transcription. *Cell Host Microbe* **12**, 97–108 (2012).
92. Kessing, C. F. *et al.* In vivo suppression of HIV rebound by didehydro-Cortistatin A, a “block-and-lock” strategy for HIV-1 cure. *Cell Rep.* **21**, 600–611 (2017).
93. Vanham, G. & Van Gulck, E. Can immunotherapy be useful as a ‘functional cure’ for infection with Human Immunodeficiency Virus-1? *Retrovirology* **9**, 72 (2012).
94. Caskey, M. *et al.* Broadly Neutralizing Antibodies for HIV-1 Prevention or Immunotherapy. *N. Engl. J. Med.* **375**, 2019–2021 (2016).
95. Salk, J. Prospects for the control of AIDS by immunizing seropositive individuals. *Nature* **327**, 473–476 (1987).
96. Levine, A. M. *et al.* Initial studies on active immunization of HIV-infected subjects using a gp120-depleted HIV-1 Immunogen: long-term follow-up. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr. Hum. Retrovirology Off. Publ. Int. Retrovirology Assoc.* **11**, 351–364 (1996).
97. Lazrek, M. *et al.* Various approaches of therapeutic vaccination for the treatment of HIV type 1 infection. *Ann. Biol. Clin. (Paris)* **63**, 581–588 (2005).
98. Mothe, B. *et al.* Definition of the viral targets of protective HIV-1-specific T cell responses. *J. Transl. Med.* **9**, 208 (2011).
99. Fleury, H. *et al.* Therapeutic Vaccine Against HIV, Viral Variability, Cytotoxic T Lymphocyte Epitopes, and Genetics of Patients. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **34**, 27–30 (2018).
100. Mudd, P. A. *et al.* Vaccine-induced CD8+ T cells control AIDS virus replication. *Nature* **491**, 129–133 (2012).
101. Cobb, A. *et al.* P19-45. Development of a therapeutic HIV vaccine comprised of autologous dendritic cells loaded with a mixture of lipopeptide HIV antigens. *Retrovirology* **6**, P365 (2009).
102. Salmon-Céron, D. *et al.* Immunogenicity and safety of an HIV-1 lipopeptide vaccine in healthy adults: a phase 2 placebo-controlled ANRS trial. *AIDS Lond. Engl.* **24**, 2211–2223 (2010).
103. Cobb, A. *et al.* Development of a HIV-1 lipopeptide antigen pulsed therapeutic dendritic cell vaccine. *J. Immunol. Methods* **365**, 27–37 (2011).
104. Dereuddre-Bosquet, N. *et al.* HIV specific responses induced in nonhuman primates with ANRS HIV-Lipo-5 vaccine combined with rMVA-HIV prime or boost immunizations. *Vaccine* **33**, 2354–2359 (2015).
105. Frey, S. E. *et al.* Phase I/II randomized trial of safety and immunogenicity of LIPO-5 alone, ALVAC-HIV (vCP1452) alone, and ALVAC-HIV (vCP1452) prime/LIPO-5 boost in healthy, HIV-1-uninfected adult participants. *Clin. Vaccine Immunol. CVI* **21**, 1589–1599 (2014).
106. Schmitz, J. E. *et al.* Control of viremia in simian immunodeficiency virus infection by CD8+ lymphocytes. *Science* **283**, 857–860 (1999).
107. Borrow, P. *et al.* Virus-specific CD8+ cytotoxic T-lymphocyte activity associated with control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 infection. *J. Virol.* **68**, 6103–6110 (1994).
108. Fu, T.-M. *et al.* Evaluation of Cellular Immune Responses in Subjects Chronically Infected with HIV Type 1. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **23**, 67–76 (2007).
109. Goulder, P. J. R. & Watkins, D. I. HIV and SIV CTL escape: implications for vaccine design. *Nat. Rev. Immunol.* **4**, 630–640 (2004).

110. McMichael, A. & Hanke, T. The quest for an AIDS vaccine: is the CD8<sup>+</sup> T-cell approach feasible? *Nat. Rev. Immunol.* **2**, 283–291 (2002).
111. Parham, P. Immunology. Deconstructing the MHC. *Nature* **360**, 300–301 (1992).
112. Owen, J., Punt, J. & Stranford, S. *Immunologie - 7e édition: Le cours de Janis Kuby avec questions de révision.* (Dunod, 2014).
113. Barry, M. & Bleackley, R. C. Cytotoxic T lymphocytes: all roads lead to death. *Nat. Rev. Immunol.* **2**, 401–409 (2002).
114. Kaslow, R. A. *et al.* Influence of combinations of human major histocompatibility complex genes on the course of HIV-1 infection. *Nat. Med.* **2**, 405–411 (1996).
115. Kiepiela, P. *et al.* CD8<sup>+</sup> T-cell responses to different HIV proteins have discordant associations with viral load. *Nat. Med.* **13**, 46–53 (2007).
116. Kiepiela, P. *et al.* Dominant influence of HLA-B in mediating the potential co-evolution of HIV and HLA. *Nature* **432**, 769–775 (2004).
117. Harari, A. *et al.* Skewed association of polyfunctional antigen-specific CD8 T cell populations with HLA-B genotype. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **104**, 16233–16238 (2007).
118. Collins, K. L. *et al.* HIV-1 Nef protein protects infected primary cells against killing by cytotoxic T lymphocytes. *Nature* **391**, 397–401 (1998).
119. Goulder, P. J. R. & Walker, B. D. HIV and HLA Class I: an evolving relationship. *Immunity* **37**, 426–440 (2012).
120. Phillips, R. E. *et al.* Human immunodeficiency virus genetic variation that can escape cytotoxic T cell recognition. *Nature* **354**, 453–459 (1991).
121. Borrow, P. *et al.* Antiviral pressure exerted by HIV-1-specific cytotoxic T lymphocytes (CTLs) during primary infection demonstrated by rapid selection of CTL escape virus. *Nat. Med.* **3**, 205–211 (1997).
122. Deng, K. *et al.* Broad CTL response is required to clear latent HIV-1 due to dominance of escape mutations. *Nature* **517**, 381–385 (2015).
123. Nixon, D. F. *et al.* HIV-1 gag-specific cytotoxic T lymphocytes defined with recombinant vaccinia virus and synthetic peptides. *Nature* **336**, 484–487 (1988).
124. A. Llano. *et al.* Best-Characterized HIV-1 CTL Epitopes: The 2013 Update. *HIV Mol Immunol* (2013).
125. Chakraborty, S. *et al.* Characterization of the Protective HIV-1 CTL Epitopes and the Corresponding HLA Class I Alleles: A Step towards Designing CTL Based HIV-1 Vaccine. *Adv. Virol.* **2014**, (2014).
126. Mallal, S. *et al.* Association between presence of HLA-B\*5701, HLA-DR7, and HLA-DQ3 and hypersensitivity to HIV-1 reverse-transcriptase inhibitor abacavir. *Lancet Lond. Engl.* **359**, 727–732 (2002).
127. Mallal, S. *et al.* HLA-B\*5701 Screening for Hypersensitivity to Abacavir. *N. Engl. J. Med.* **358**, 568–579 (2008).
128. Cesbron-Gautier, A. *et al.* Technologie Luminex : application aux typages HLA par biologie moléculaire (PCR-SSO) et à l'identification des anticorps anti-HLA. *Ann. Biol. Clin. (Paris)* **62**, 93–98 (2004).
129. Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **74**, 5463–5467 (1977).
130. Kim, Y. *et al.* Immune epitope database analysis resource. - PubMed - NCBI. *Nucleic Acids Res.* (2012).
131. Nielsen, M. *et al.* NetMHCpan, a method for quantitative predictions of peptide binding to any HLA-A and -B locus protein of known sequence. *PLoS One* **2**, e796 (2007).

132. Nielsen, M. *et al.* Reliable prediction of T-cell epitopes using neural networks with novel sequence representations. *Protein Sci. Publ. Protein Soc.* **12**, 1007–1017 (2003).
133. Nielsen, M. & Andreatta, M. NetMHCpan-3.0; improved prediction of binding to MHC class I molecules integrating information from multiple receptor and peptide length datasets. *Genome Med.* **8**, 33 (2016).
134. Tumiotto, C. *et al.* Sanger and Next-Generation Sequencing data for characterization of CTL epitopes in archived HIV-1 proviral DNA. *PLoS ONE* **12**, (2017).
135. Mack, S. J. *et al.* HLA-A, -B, -C, -DRB1 Allele and Haplotype Frequencies Distinguish Eastern European Americans from the General European American Population. *Tissue Antigens* **73**, 17–32 (2009).
136. Boutwell, C. L. & Essex, M. Identification of HLA Class I-Associated Amino Acid Polymorphisms in the HIV-1C Proteome. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **23**, 165–174 (2007).
137. Macdonald, W. A. *et al.* A Naturally Selected Dimorphism within the HLA-B44 Supertype Alters Class I Structure, Peptide Repertoire, and T Cell Recognition. *J. Exp. Med.* **198**, 679–691 (2003).
138. Roquebert, B. & Leleu, J. La transcriptase inverse du VIH-1 : rôle du domaine de connexion et de la RNase H dans la résistance aux antirétroviraux. **14**, 11 (2010).
139. Allen, T. M. *et al.* Tat-specific cytotoxic T lymphocytes select for SIV escape variants during resolution of primary viraemia. *Nature* **407**, 386–390 (2000).
140. Barouch, D. H. *et al.* Eventual AIDS vaccine failure in a rhesus monkey by viral escape from cytotoxic T lymphocytes. *Nature* **415**, 335–339 (2002).
141. Jones, N. A. *et al.* Determinants of human immunodeficiency virus type 1 escape from the primary CD8+ cytotoxic T lymphocyte response. *J. Exp. Med.* **200**, 1243–1256 (2004).
142. Papuchon, J. *et al.* Kinetics of HIV-1 CTL Epitopes Recognized by HLA I Alleles in HIV-Infected Individuals at Times near Primary Infection: The Provir/Latitude45 Study. *PLOS ONE* **9**, e100452 (2014).
143. Allen, T. M. *et al.* Selective Escape from CD8+ T-Cell Responses Represents a Major Driving Force of Human Immunodeficiency Virus Type 1 (HIV-1) Sequence Diversity and Reveals Constraints on HIV-1 Evolution. *J. Virol.* **79**, 13239–13249 (2005).
144. O'Connor, D. *et al.* Understanding cytotoxic T-lymphocyte escape during simian immunodeficiency virus infection. *Immunol. Rev.* **183**, 115–126 (2001).
145. Gray, G. E. *et al.* Approaches to preventative and therapeutic HIV vaccines. *Curr. Opin. Virol.* **17**, 104–109 (2016).
146. Palmer, S. *et al.* Low-level viremia persists for at least 7 years in patients on suppressive antiretroviral therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 3879–3884 (2008).
147. Lucas, É. *et al.* Types, groupes et sous-types de VIH diagnostiqués en France depuis 2003 : données de huit années de surveillance. *Bull. Épidémiologique Hebd.* (2012).
148. Benaroch, P. & Le Gall, S. Stratégies d'échappement au système immunitaire du VIH. *médecine/sciences* **15**, 950 (1999).
149. Stavrou, S. & Ross, S. R. APOBEC3 Proteins in Viral Immunity. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **195**, 4565–4570 (2015).
150. Tenzer, S. *et al.* Modeling the MHC class I pathway by combining predictions of proteasomal cleavage, TAP transport and MHC class I binding. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* **62**, 1025–1037 (2005).
151. Derby, M. A. *et al.* High-Avidity CTL Exploit Two Complementary Mechanisms to Provide Better Protection Against Viral Infection Than Low-Avidity CTL. *J. Immunol.* **166**, 1690–1697 (2001).
152. Almeida, J. R. *et al.* Superior control of HIV-1 replication by CD8+ T cells is reflected by their avidity, polyfunctionality, and clonal turnover. *J. Exp. Med.* **204**, 2473–2485 (2007).

153. Abbas, A. K. & Lichtman, A. H. *Les bases de l'immunologie fondamentale et clinique*. (Elsevier Masson, 2009).
154. Milicic, A. *et al.* CD8+ T cell epitope-flanking mutations disrupt proteasomal processing of HIV-1 Nef. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **175**, 4618–4626 (2005).
155. Zimbwa, P. *et al.* Precise identification of a human immunodeficiency virus type 1 antigen processing mutant. *J. Virol.* **81**, 2031–2038 (2007).
156. Frahm, N. *et al.* Consistent cytotoxic-T-lymphocyte targeting of immunodominant regions in human immunodeficiency virus across multiple ethnicities. *J. Virol.* **78**, 2187–2200 (2004).
157. Larder, B. A. *et al.* Quantitative detection of HIV-1 drug resistance mutations by automated DNA sequencing. *Nature* (1993). doi:10.1038/365671a0
158. Garcia-Diaz, A. *et al.* Evaluation of the Roche prototype 454 HIV-1 ultradeep sequencing drug resistance assay in a routine diagnostic laboratory. *J. Clin. Virol. Off. Publ. Pan Am. Soc. Clin. Virol.* **58**, 468–473 (2013).
159. Mohamed, S. *et al.* Comparison of ultra-deep versus Sanger sequencing detection of minority mutations on the HIV-1 drug resistance interpretations after virological failure: *AIDS* **28**, 1315–1324 (2014).
160. Li, J. Z. *et al.* Low-frequency HIV-1 drug resistance mutations and risk of NNRTI-based antiretroviral treatment failure: a systematic review and pooled analysis. *JAMA* **305**, 1327–1335 (2011).
161. Bansal, V. *et al.* Minority K65R Variants and Early Failure of Antiretroviral Therapy in HIV-1–infected Eritrean Immigrant. *Emerg. Infect. Dis.* **17**, 1966–1968 (2011).
162. Yang, O. O. Candidate Vaccine Sequences to Represent Intra- and Inter-Clade HIV-1 Variation. *PLOS ONE* **4**, e7388 (2009).
163. Leslie, A. J. *et al.* HIV evolution: CTL escape mutation and reversion after transmission. *Nat. Med.* **10**, 282–289 (2004).
164. Turnbull, E. L. *et al.* HIV-1 Epitope-Specific CD8+ T Cell Responses Strongly Associated with Delayed Disease Progression Cross-Recognize Epitope Variants Efficiently. *J. Immunol.* **176**, 6130–6146 (2006).

## SERMENT DE GALIEN

Je jure, en présence des maîtres de la Faculté, des conseillers de l'ordre des Pharmaciens et de mes condisciples :

D'honorer ceux qui m'ont instruit(e) dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement ;

D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement ;

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine.

En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert(e) d'opprobre et méprisé(e) de mes confrères si j'y manque.

## **Définition d'épitopes CTL dans l'ADN VIH-1 archivé et présentables par le HLA-B : perspective vaccinale**

Grâce aux antirétroviraux, il est désormais possible de contrôler durablement la réplication du VIH-1 chez les patients sous traitement. L'objectif est maintenant de trouver de nouvelles stratégies thérapeutiques visant soit une éradication du virus soit une guérison « fonctionnelle ». L'une d'entre elles consiste en l'élaboration d'un vaccin thérapeutique impliquant les lymphocytes T cytotoxiques (CTL). La mise au point d'un vaccin efficace doit inévitablement tenir compte de la variabilité des épitopes CTL dans les réservoirs viraux et de leur présentation par les molécules HLA de classe I.

Dans cette étude réalisée sur des virus archivés chez des patients infectés par le VIH-1 suivis au CHU de Bordeaux, nous confirmons l'importante variabilité des épitopes CTL au sein de l'ADN proviral à partir duquel la réplication virale sera généralement réinitiée lors d'un arrêt thérapeutique. Nos résultats montrent que les mutations à l'origine de cette variabilité peuvent diminuer l'affinité théorique de ces épitopes pour les molécules HLA et empêcher leur présentation. Par ailleurs, nous avons identifié des épitopes présentables par les allèles HLA-B les plus fréquents dans la population caucasienne et africaine, épitopes hautement conservés ou dont la variabilité n'affecte pas l'affinité pour les molécules HLA. Ces épitopes pourraient être utilisés pour l'élaboration d'un vaccin lipopeptidique qui tiendra compte de la génétique immunitaire de l'hôte.

**Mots clés :** VIH-1, Vaccination thérapeutique, Épitopes CTL, HLA de classe I, Immunogénétique, Guérison

---

### **Definition of HLA-B restricted CTL epitopes in archived HIV-1 DNA: towards a vaccine**

Due to advances in antiretroviral therapy (ART), HIV-1 replication can nowadays be controlled among treated patients. Now, the objective is to find new therapeutic strategies to either eradicate the virus or achieve a "functional cure". Therapeutic vaccines inducing cytotoxic T lymphocytes (CTL) are one of the most promising approaches. An effective vaccine must take into account the CTL epitopes variability in viral reservoirs and the human leukocytes antigen (HLA)-class I- allele-specific restriction.

Using data from archived virus in HIV-1-infected patients from the Bordeaux University Hospital, we provide confirmation of important CTL epitope variability in HIV-1 proviral DNA, a major source contributing to viral rebound after stopping ART. We also found that mutations leading to this variability can affect the predicting MHC-I-epitope binding affinity and prevent their recognition. Moreover, we have identified highly conserved epitopes and epitopes carrying mutations with no significant effect on binding affinity, which are restricted by the most common HLA-B alleles in Caucasians and Africans. These epitopes could be used for the development of a multi-epitope-based peptide vaccine according to the genetics of patients.

**Keywords:** HIV-1, Therapeutic vaccines, CTL epitopes, HLA alleles, Immunogenetics, Viral cure

---

**DISCIPLINE :** PHARMACIE – BIOLOGIE MEDICALE

---

#### **INTITULE ET ADRESSE DU LABORATOIRE :**

Université Bordeaux Segalen – Faculté des Sciences Pharmaceutiques  
146 rue Léo Saignat – 33076 Bordeaux Cedex