



Open Archive TOULOUSE Archive Ouverte (OATAO)

OATAO is an open access repository that collects the work of Toulouse researchers and makes it freely available over the web where possible.

This is an author-deposited version published in : <http://oatao.univ-toulouse.fr/>
Eprints ID : 17536

To cite this version :

Lemaitre, Julien. *Rôle des cellules myéloïdes dans la persistance virale au cours de l'infection par le VIH : caractérisation de la moelle osseuse et du sang périphérique du modèle macaque cynomologus infecté par le virus SIVmac251*. Thèse d'exercice, Médecine vétérinaire, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse - ENVT, 2016, 93 p.

Any correspondence concerning this service should be sent to the repository administrator: staff-oatao@inp-toulouse.fr.

ROLE DES CELLULES MYELOÏDES DANS LA PERSISTANCE VIRALE AU COURS DE L'INFECTION PAR LE VIH : CARACTERISATION DE LA MOELLE OSSEUSE ET DU SANG PERIPHERIQUE DU MODELE MACAQUE CYNOMOLOGUS INFECTE PAR LE VIRUS DU SIVMAC251

THESE
pour obtenir le grade de
DOCTEUR VETERINAIRE

DIPLOME D'ETAT

*présentée et soutenue publiquement
devant l'Université Paul-Sabatier de Toulouse*

par

LEMAITRE, Julien
Né, le 26 avril 1991 à LE MANS (72)

Directeur de thèse : Mme Séverine BOULLIER

JURY

PRESIDENT :
M. Christophe PASQUIER

Professeur à l'Université Paul-Sabatier de TOULOUSE

ASSESEURS :
Mme Séverine BOULLIER
M. Jean-Luc GUERIN

Maître de Conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE
Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

MEMBRE INVITE :
M. Roger LE GRAND

Directeur du service Immunologie des Infections Virales et des Maladies Auto-immunes
(U1184) au CEA de Fontenay-aux-Roses

Répartition des Enseignants-Chercheurs par Département.

Mise à jour : 06/09/2016

DIRECTRICE : ISABELLE CHMITELIN

ELEVAGE ET PRODUITS/SANTÉ PUBLIQUE VÉTÉRINAIRE	SCIENCES BIOLOGIQUES ET FONCTIONNELLES	SCIENCES CLINIQUES DES ANIMAUX DE COMPAGNIE, DE SPORT ET DE LOISIRS
<p>Responsable : M. SANS</p> <p><u>ALIMENTATION ANIMALE :</u> M. ENJALBERT Francis, PR Mme PRIYMENKO Nathalie, MC Mme MEYNADIER Annabelle, MC</p> <p><u>EPIDEMIOLOGIE :</u> Mme Mathilde PAUL, MC</p> <p><u>MALADIES REGLEMENTEES-ZOONOSES-MEDECINE PREVENTIVE DES CARNIVORES DOMESTIQUES-DROIT VETERINAIRE :</u> M. PICAUVET Dominique, PR</p> <p><u>PARASITOLOGIE-ZOOLOGIE :</u> M. FRANC Michel, PR M. JACQUIET Philippe, PR M. LIENARD Emmanuel, MC Mme BOUHSIRA Emilie, MC</p> <p><u>HYGIENE ET INDUSTRIE DES ALIMENTS :</u> M. BRUGERE Hubert, PR M. BAILLY Jean-Denis, PR Mme BIBBAL Delphine, MC Mme COSTES Laura, AERC Mme DAVID Laure, MCC</p> <p><u>PATHOLOGIE DE LA REPRODUCTION :</u> M. BERTHELOT Xavier, PR M. BERGONIER Dominique, MC Mme CHASTANT-MAILLARD Sylvie, PR Mme HAGEN-PICARD Nicole, PR M. NOUVEL Laurent-Xavier, MC Mme MILA Hanna, MC</p> <p><u>PATHOLOGIE DES RUMINANTS :</u> M. SCHELCHER François, PR M. FOUCRAS Gilles, PR M. CORBIERE Fabien, MC M. MAILLARD Renaud, MC M. MEYER Gilles, PR</p> <p><u>PRODUCTION ET PATHOLOGIE AVIAIRE ET PORCINE :</u> Mme WARET-SZKUTA Agnès, MC M. JOUGLAR Jean-Yves, MC M. GUERIN Jean-Luc, PR M. LE LOC'H Guillaume, MC</p> <p><u>PRODUCTIONS ANIMALES AMELIORATION GENETIQUE ECONOMIE :</u> M. DUCOS Alain, PR M. SANS Pierre, PR M. RABOISSON Didier, MC</p>	<p>Responsable : Mme GAYRARD</p> <p><u>ANATOMIE :</u> M. MOGICATO Giovanni, MC M. LIGNEREUX Yves, PR Mme DEVIERS Alexandra, MC</p> <p><u>ANATOMIE PATHOLOGIQUE - HISTOLOGIE :</u> M. DELVERDIER Maxence, PR Mme LETRON-RAYMOND Isabelle, MC Mme BOURGES-ABELLA Nathalie, PR Mme LACROUX Caroline, PR</p> <p><u>BIOLOGIE MOLECULAIRE :</u> Mme BOUCLAINVILLE-CAMUS Christelle, MC</p> <p><u>MICROBIOLOGIE – IMMUNOLOGIE - MALADIES INFECTIEUSES :</u> M. MILON Alain, PR M. BERTAGNOLI Stéphane, PR M. VOLMER Romain, MC Mme BOULLIER Séverine, MC Mme DANIELS Héléne, MC</p> <p><u>BIostatISTIQUES :</u> M. CONCORDET Didier, PR M. LYAZRHI Faouzi, MC</p> <p><u>PHARMACIE-TOXICOLOGIE :</u> M. PETIT Claude, PR Mme CLAUW Martine, PR M. GUERRE Philippe, PR M. JAEG Philippe, MC</p> <p><u>PHYSIOLOGIE –PHARMACOLOGIE THERAPEUTIQUE :</u> M. BOUSQUET-MELOU Alain, PR Mme GAYRARD-TROY Véronique, PR Mme FERRAN Aude, MC M. LEFEBVRE Hervé, PR</p> <p><u>BIOCHIMIE :</u> Mme BENNIS-BRET Lydie, MC</p> <p><u>ANGLAIS :</u> M. SEVERAC Benoît, PLPA Mme MICHAUD Françoise, PCEA</p>	<p>Responsable : Mme CADIERGUES</p> <p><u>ANESTHESIOLOGIE</u> M. VERWAERDE Patrick, MC</p> <p><u>CHIRURGIE :</u> M. AUTEFAGE André, PR M. ASIMUS Erik, MC M. MATHON Didier, MC Mme MEYNAUD-COLLARD Patricia, MC Mme PALIERNE Sophie, MC</p> <p><u>MEDECINE INTERNE :</u> Mme DIQUELOU Armelle, MC M. DOSSIN Olivier, MC Mme LAVOUE Rachel, MC Mme GAILLARD-THOMAS Elodie, MCC</p> <p><u>OPHTALMOLOGIE :</u> M. DOUET Jean-Yves, MC</p> <p><u>DERMATOLOGIE :</u> Mme CADIERGUES Marie-Christine, PR</p> <p><u>IMAGERIE MEDICALE</u> M. CONCHOU Fabrice, MC</p> <p><u>BIOLOGIE MOLECULAIRE :</u> Mme TRUMEL Catherine, PR</p> <p><u>PATHOLOGIE DES EQUIDES :</u> M. CUEVAS RAMOS Gabriel, MC Mme PRADIER Sophie, MC Mme LALLEMAND Elodie, AERC</p>

Remerciement

A Monsieur le Professeur Christophe Pasquier

Professeur de l'Université Paul Sabatier
Praticien Hospitalier
Virologie

Qui nous fait l'honneur d'accepter la présidence du jury de thèse.
Hommages respectueux.

A Madame le Docteur Séverine Boullier

Maître de Conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse
Immunologie

Qui a accepté d'encadrer ce projet et pour m'avoir guidé dans la réalisation de cette thèse. Qu'elle trouve ici toute l'expression de ma reconnaissance.

A Monsieur le Professeur Jean-Luc Guérin

Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse
Aviculture et pathologie aviaire

Pour avoir accepté de prendre part à ce jury de thèse, pour ses conseils avisés et pour m'avoir guidé dans ce difficile chemin vers la recherche. Sincères remerciements.

A Monsieur le Docteur Roger Le Grand

Directeur du Service Immunologie des Infections Virales et des Maladies Auto-immunes (U1184) au CEA de Fontenay-aux-Roses

Qui m'a accueilli au sein de l'unité, qui a accepté d'encadrer ce projet au quotidien, pour sa confiance et ses précieux enseignements. Qu'il trouve ici toute l'expression de ma reconnaissance.

Table des matières

I. INTRODUCTION.....	4
1. <i>Infection par le VIH :</i>	4
A. Brève histoire de la pandémie et de la découverte du VIH.....	4
B. Etiologie et cycle viral.....	8
2. <i>Etablissement des réservoirs viraux au cours de l'infection par le VIH et son traitement</i> <i>13</i>	
A. Tissus lymphoïdes associés au tube digestif.....	14
B. Nœuds lymphatiques.....	16
C. Système nerveux central.....	18
D. Le tractus génital.....	21
E. Le tissu adipeux.....	23
F. Macrophages.....	25
G. Bilan.....	25
3. <i>Inflammation systémique au cours de l'infection par le VIH.....</i>	<i>26</i>
A. Le VIH : une maladie inflammatoire chronique.....	26
B. Translocation microbienne, immunité innée et inflammation chronique.....	27
C. Conséquences de l'inflammation chronique sur l'immunité innée.....	31
4. <i>Impact du traitement précoce sur le contrôle de l'infection.....</i>	<i>42</i>
II. OBJECTIF DE TRAVAIL.....	45
III. MATERIELS ET METHODES.....	48
1. <i>Sujets et prélèvements de sang total et de moelle osseuse.....</i>	<i>48</i>
2. <i>Réactifs et solutions.....</i>	<i>48</i>
3. <i>Préparation du panel d'anticorps couplés aux métaux lourds (Lanthanides).....</i>	<i>49</i>
4. <i>Préparation des cellules et stockage.....</i>	<i>49</i>
5. <i>La technologie de cytométrie de masse.....</i>	<i>50</i>
A. De la cytométrie en flux à la cytométrie de masse.....	50
B. Fonctionnement de la cytométrie de masse.....	51
C. Avantages et inconvénients de la cytométrie de masse.....	52
6. <i>Marquage et acquisition au cytomètre de masse.....</i>	<i>53</i>
7. <i>Traitement des données et analyse.....</i>	<i>54</i>
IV. RESULTATS.....	55
1. <i>Approche expérimentale.....</i>	<i>55</i>
2. <i>Mise au point du marquage des cellules myéloïdes.....</i>	<i>57</i>

3.	<i>Caractérisation des populations myéloïdes au repos dans la moelle osseuse et la circulation du macaque Cynomolgus sain.....</i>	58
A.	Analyse hiérarchique multidimensionnelle classique des deux compartiments chez les macaques sains	
B.	Analyse en clusters SPADE des populations myéloïdes chez le macaque sain.....	62
4.	<i>Impact de l'infection SIV chronique sur les populations myéloïdes médullaires et circulantes.....</i>	69
V.	DISCUSSION	74
VI.	ANNEXES	77
VII.	BIBLIOGRAPHIE.....	78

Table des illustrations

FIGURE 1 : PHYLOGENIE DES LENTIVIRUS. RELATIONS EVOLUTIVES DES SEQUENCES DE POL (770 ACIDES AMINES) ISOLEES A PARTIR DE NOMBREUX LENTIVIRUS.....	6
FIGURE 3 : SCHEMA SIMPLIFIE DU CYCLE VIRAL DU VIH-1	11
FIGURE 4 : CONTRACTION LENTE DU RESERVOIR VIRAL LATENT AUTOUR D'UN GROUPE DE CELLULES T CD4 ⁺ , PRINCIPALEMENT T _{SCM} ET T _{CM}	13
FIGURE 5 : DEMONSTRATION ENDOSCOPIQUE ET HISTOLOGIQUE DE LA DEPLETION EN CELLULES T CD4 ⁺ DU TUBE DIGESTIF DE PATIENTS ATTEINTS DE SIDA. LES IMAGES (A) ET (B) MONTRENT L'ILEON TERMINAL PAR ENDOSCOPIE.....	15
FIGURE 6 : MIGRATION CELLULAIRE ET VIRALE DEPUIS LE SANG PERIPHERIQUE VERS LE CERVEAU AU COURS DE L'INFECTION PAR LE VIH.	20
FIGURE 7 : QUANTIFICATION DE L'ADN ET DE L'ARN DU SIV DANS LES CELLULES DU TISSU ADIPEUX.	24
FIGURE 9 : MODIFICATIONS DE L'EPITHELIUM INTESTINAL DURANT L'INFECTION DU VIH ³³	29
FIGURE 11 : MDC ET PDC DURANT L'INFECTION PAR LE VIH ¹³⁷	41
FIGURE 13 : LES CONTROLEURS APRES TRAITEMENT (PTC) DIFFERENT DES CONTROLEURS NATURELS DU VIH (HIC) PAR LE PROFIL DU HLA DE CLASSE I, LA FREQUENCE ET LA QUALITE DE LA REPOSE ANTIVIRALE T CD8 SPECIFIQUE ET DU NIVEAU D'ACTIVATION DES CELLULES T CD8 ⁺¹⁵³	44
FIGURE 15 : SUIVI LONGITUDINAL DU COMPTAGE LYMPHOCYTAIRE SANGUIN (BLEU) ET DE LA CHARGE VIRALE PLASMATIQUE (ROUGE) CHEZ LES DEUX MACAQUES CYNOMOLGUS INFECTES PAR LE SIVMAC251.	56
FIGURE 17 : FENETRAGE HIERARCHIQUE CLASSIQUE MONTRE ICI DANS LE SANG D'UN MACAQUE SAIN.....	58
FIGURE 18 : ANALYSE PAR FENETRAGE DES POPULATIONS CELLULAIRES DU SANG ET DE LA MOELLE OSSEUSE DE MACAQUES SAINS.	60
FIGURE 19 : DISTRIBUTION DES POPULATIONS DE MONOCYTES ET DE CELLULES DENDRITIQUES MYELOÏDES (MDC) ET PLASMACYTOÏDES (PDC) DANS LE SANG ET LA MOELLE OSSEUSE DES MACAQUES SAINS.	61
FIGURE 21 : « VOLCANO PLOT » REPRESENTANT LES DIFFERENCES D'ABONDANCE DES CLUSTERS DE CELLULES MYELOÏDES CHEZ LES MACAQUES TEMOINS EN FONCTION DE LA SIGNIFICATIVITE DU T-TEST (P<0.05).....	64
FIGURE 22 : HEATMAP REPRESENTANT LE NIVEAU D'EXPRESSION DES 33 MARQUEURS POUR CHACUN DES 100 CLUSTERS OBTENUS DANS LE SANG ET LA MOELLE OSSEUSE DES MACAQUES SAINS.....	66
FIGURE 23 : IMPACT DE L'INFECTION PAR LE SIV SUR LES POPULATIONS MYELOÏDES MEDULLAIRES ET CIRCULANTES DES MACAQUES CYNOMOLGUS.	70
FIGURE 24 : VARIATION DES SOUS-POPULATIONS LEUCOCYTAIRES MEDULLAIRES ET SANGUINES AU COURS DE L'INFECTION PAR LE SIV.....	72

I. Introduction

1. Infection par le VIH :

A. Brève histoire de la pandémie et de la découverte du VIH

1) Découverte du VIH

En 1981, cinq cas de pneumonie à *Pneumocystis carinii* associés à une déplétion sévère des lymphocytes T sont décrits chez des hommes à Los Angeles¹. En France des cas similaires sont également rapportés et la description clinique du syndrome de l'immunodéficience acquise (SIDA) commence à se préciser. L'observation de signes peu spécifiques (fièvre, perte de poids, adénopathies chroniques généralisées), ainsi que de signes caractéristiques d'un déficit de l'immunité cellulaire (sarcome de Kaposi, pneumonie à *Pneumocystis carinii*, autres infections opportunistes graves) permettent de suivre l'incidence de ce syndrome¹. Très vite l'hypothèse d'un agent infectieux, probablement viral, transmis par voie sexuelle ou par transfusion est formulée. A cette date, le premier rétrovirus humain, virus T-lymphotropique humain 1 (HTLV-1), venait d'être décrit, et le rétrovirus leucémogène félin (FeLV) était démontré comme inducteur d'une immunodéficience sévère chez les chats². L'hypothèse d'un agent rétroviral nouveau chez l'homme est donc émise. En 1983, l'équipe de l'Institut Pasteur composée du Pr Willy Rozenbaum, du Pr Françoise Brun-Vézinet, du Pr Christine Rouzioux, du Pr Luc Montagnier, du Pr Jean-Claude Chermann et du Pr Françoise Barré-Sinoussi isole et cultive des cellules provenant d'une biopsie d'un nœud lymphatique d'un patient souffrant de lymphadénopathie généralisée³. Les cultures des lymphocytes T, réalisées en présence d'interleukine-2, ont mis en évidence l'activité d'une enzyme, la transcriptase inverse, caractéristique des rétrovirus. Ils observent également l'effet cytopathique du virus sur ces cellules. L'observation en microscopie électronique du virus bourgeonnant à la surface de cellule confirme l'hypothèse d'un agent viral³. La structure des virions observée était proche de celle de rétrovirus décrit chez les chèvres et les chevaux. Il fut d'abord nommé virus associé à la lymphadénopathie (LAV), puis désigné virus de l'immunodéficience humaine-1 (VIH-1). Dans l'année suivant la découverte du virus, un test sérologique a été mis au point et a permis de réaliser des études épidémiologiques à grande échelle, qui confirment l'association entre SIDA et infection par le VIH-1. Ces recherches furent à l'origine de la mise au point des premiers tests de dépistage de

l'infection par le VIH. Parallèlement le récepteur CD4, exprimé par une sous population de lymphocytes, est identifié comme cible du virus pour son entrée dans la cellule⁴. Dix ans plus tard, un corécepteur d'entrée du virus est découvert : le récepteur aux chimiokines CCR5. Ainsi, les individus porteurs de la mutation $\Delta 32$ du gène codant CCR5 ($\Delta 32$ -CCR5) n'expriment pas ce récepteur et montrent une résistance à l'infection par le VIH⁵. A la même époque, le CXCR4 est identifié comme le corécepteur de l'entrée du VIH à tropisme lymphocytaire⁶. La stratégie et le mécanisme d'entrée du virus commencent alors à se préciser.

2) Origine du VIH et classification

Depuis la découverte du VIH-1, l'origine de cette épidémie émergente a fait l'objet d'intenses recherches. En 1986, un virus morphologiquement similaire mais antigéniquement différent fut isolé chez des patients ouest africains atteints de SIDA⁷. Ce virus, nommé virus de l'immunodéficience humaine de type 2 (VIH-2), était génétiquement éloigné du VIH-1 mais relativement proche d'un virus causant une immunodéficience chez les macaques. Un peu plus tard, d'autres virus furent collectivement appelés virus de l'immunodéficience simienne (SIV) et caractérisés par leur suffixes en fonction de l'espèce d'origine : le singe vert africain (agm), le singe mangabey fumé (sm), le mandrill (mnd), le chimpanzé (cpz), le macaque (mac) et bien d'autres⁸ (**Figure 1**). Ces virus semblent largement non pathogènes chez leur hôte naturel, ce qui montre une longue coévolution hôte-pathogène⁹. Des études supplémentaires confirment également que le SIVmac n'est pas un pathogène naturel du macaque, mais il est apparu par accident dans les centres américains, en inoculant plusieurs espèces de macaques avec du sang ou des tissus provenant de singes mangabey fumés, naturellement infectés¹⁰. Le séquençage du VIH-1 et du VIH-2 a permis de suivre l'évolution du virus, qui proviendrait d'un transfert zoonotique de virus infectant naturellement les primates en Afrique¹¹. Ainsi, le SIVcpz infectant les chimpanzés est très homologue au VIH-1, alors que le SIVsm infectant les mangabeys couronnés est génétiquement proche du VIH-2¹².

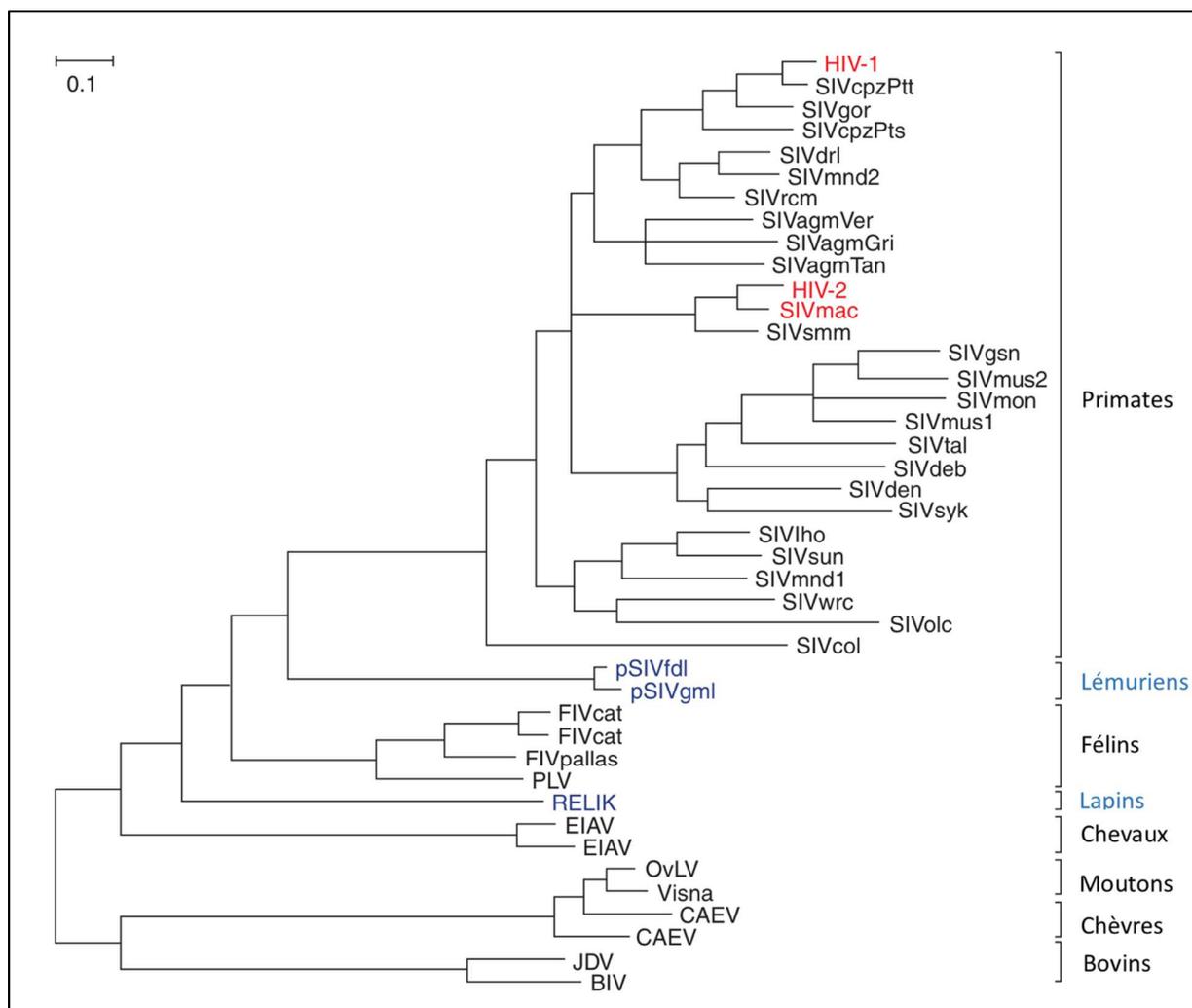


Figure 1 : Phylogénie des lentivirus. Relations évolutives des séquences de Pol (770 acides aminés) isolées à partir de nombreux lentivirus. Les espèces hôtes sont indiquées à droite. Les virus exogènes sont notés en noir, avec le SIVmac, le HIV-1 et le HIV-2 en rouge ; les virus endogènes sont en violet. L'échelle représente 0,1 acide aminé remplacé par site⁸. Adapté de Sharp PM, Hahn BH. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2011.

Le VIH-1 a été divisé en 4 sous-groupes M, N, O et P, dont chacun semble provenir d'un passage inter-espèce distinct¹³. L'hypothèse la plus probable de la transmission serait un contact entre le sang de primates infectés et la peau ou les muqueuses des chasseurs. L'épidémiologie moléculaire daterait l'apparition du groupe M du VIH-1 entre 1910 et 1930⁸. Cette infection zoonotique de l'homme est donc ancienne mais les forts changements démographiques et sociaux de la fin du 20^{ème} siècle ont favorisé la dissémination de la maladie pour devenir pandémique dans les années quatre-vingt-dix.

3) Evolution des stratégies thérapeutiques et prophylactiques

La caractérisation du cycle viral et l'identification de cibles thérapeutiques ont permis la mise au point du premier antirétroviral : l'azidothymidine (AZT) en 1987¹⁴. Cette molécule initialement utilisée à des fins anticancéreuses se révèle être un inhibiteur de la transcription inverse du virus, une étape clé du cycle des rétrovirus. Mais très vite les premières résistances à l'AZT apparaissent. L'avancée thérapeutique majeure est la mise au point de thérapies combinant plusieurs molécules antirétrovirales, limitant ainsi le développement des résistances et réduisant la morbidité et la mortalité associées à l'infection. L'association d'un inhibiteur de protéase avec deux inhibiteurs nucléosidiques de la transcriptase inverse (NRTI) forme alors la thérapie combinée antirétrovirale (cART). Malgré les avancées thérapeutiques, les ART ne rétablissent pas complètement les fonctions immunitaires et la santé des patients. Les traitements sont responsables d'effets secondaires et nécessitent d'être pris à vie. L'infection par le VIH est associée à une inflammation chronique et une activation immunitaire, qui très probablement entraîne une immunosénescence à long terme¹⁵. Les nouvelles stratégies actuellement développées cherchent l'obtention d'une guérison fonctionnelle, permettant aux patients de contrôler de façon permanente l'infection sans pour autant obtenir l'éradication complète du virus de l'organisme.

Pendant plusieurs années, les seuls moyens de prévention efficaces contre l'infection par le VIH furent le préservatif associé à l'éducation et le changement des comportements. Puis en 1994, un essai clinique montre qu'un traitement antirétroviral donné à la mère réduit significativement la transmission du virus à l'enfant pendant la grossesse¹⁶. En 2005 et 2007, deux essais cliniques montrent que la circoncision masculine favorise la protection contre l'infection¹⁷. En 2010, une nouvelle stratégie de prévention, la prophylaxie pre-exposition (iPrEX), montre que la prise quotidienne d'une combinaison d'emtricitabine et de ténofovir réduit le risque de contamination¹⁸. Enfin en 2011, une étude utilisait la cART pour réduire significativement la transmission sexuelle du VIH chez des couples séro-discordants (couples dont l'un est séropositif et pas l'autre). Les résultats indiquent que le traitement ART entraîne une charge virale indétectable et une réduction de 96% du taux de transmission entre partenaires discordant en couple.

Les stratégies vaccinales ont été développées dans les premières heures de la découverte du virus mais plus de 30 ans plus tard aucun vaccin n'est disponible. La difficulté de la vaccination contre le VIH est due à l'évolution et la mutation constante du virus lui permettant d'échapper à la réponse immunitaire. Un vaccin idéal serait capable de générer une réponse humorale formant des anticorps neutralisants à large spectre (bNAb) reconnaissant des régions conservées de l'enveloppe du VIH. La mise au point d'un tel vaccin est actuellement inaccessible mais les nombreux essais cliniques ont permis de préciser les mécanismes d'induction de la réponse vaccinale. En 2014, l'infection par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) affectait 36,9 millions de personnes dans le monde et représentait la 6ème cause de mortalité (Rapport UNAIDS 2015). Nous allons maintenant nous intéresser aux caractéristiques du cycle viral et de la physiopathologie du VIH, qui expliquent la complexité de cette infection.

B. Etiologie et cycle viral

1) *Éléments de classification du VIH et structure virale*

Le VIH est un virus appartenant aux rétrovirus, qui possède dans son génome une enzyme capable de transcription rétrograde de l'ARN en ADN, inversant ainsi le flux habituel de l'information génétique. Le VIH est du genre lentivirus, regroupant des rétrovirus connus pour induire des maladies chroniques chez les mammifères domestiques comme le mouton (virus Visna Maedi), la chèvre (virus de l'encéphalite infectieuse caprine), le cheval (virus de l'anémie infectieuse équine), le chat (virus de l'immunodéficience féline) et le bovin (virus de l'immunodéficience bovine).

Le VIH est un virus à ARN positif diploïde, c'est à dire qu'il possède deux copies de son génome ARN dont la polarité est celle de l'ARNm. Ces deux copies du génome sont encapsidées avec des enzymes virales : une transcriptase inverse, une protéase, une ribonucléase et une intégrase, toutes codées par le gène *pol* (**Figure 2**). Les protéines de capsid (p17, p24 et p7) sont codées par le gène *gag*. La nucléocapside est-elle même entourée d'une enveloppe membranaire provenant de la cellule infectée. Cette enveloppe possède 72 projections, ou spicules, composées des glycoprotéines gp120 et gp41. La gp120 interagit avec le récepteur CD4 et le corécepteur CCR5 ou CXCR4 à la surface de la cellule cible. Le tropisme cellulaire est défini par la boucle V3 de la gp120, qui est une région hypervariable reconnaissant spécifiquement CCR5 pour la souche R5, ou CXCR4

pour la souche X4. La gp41 permet l'ancrage de la gp120 à l'enveloppe viral et permet la fusion entre l'enveloppe et la membrane cellulaire, après attachement de la gp120. Ces deux protéines sont codées par le gène *env* du virus.

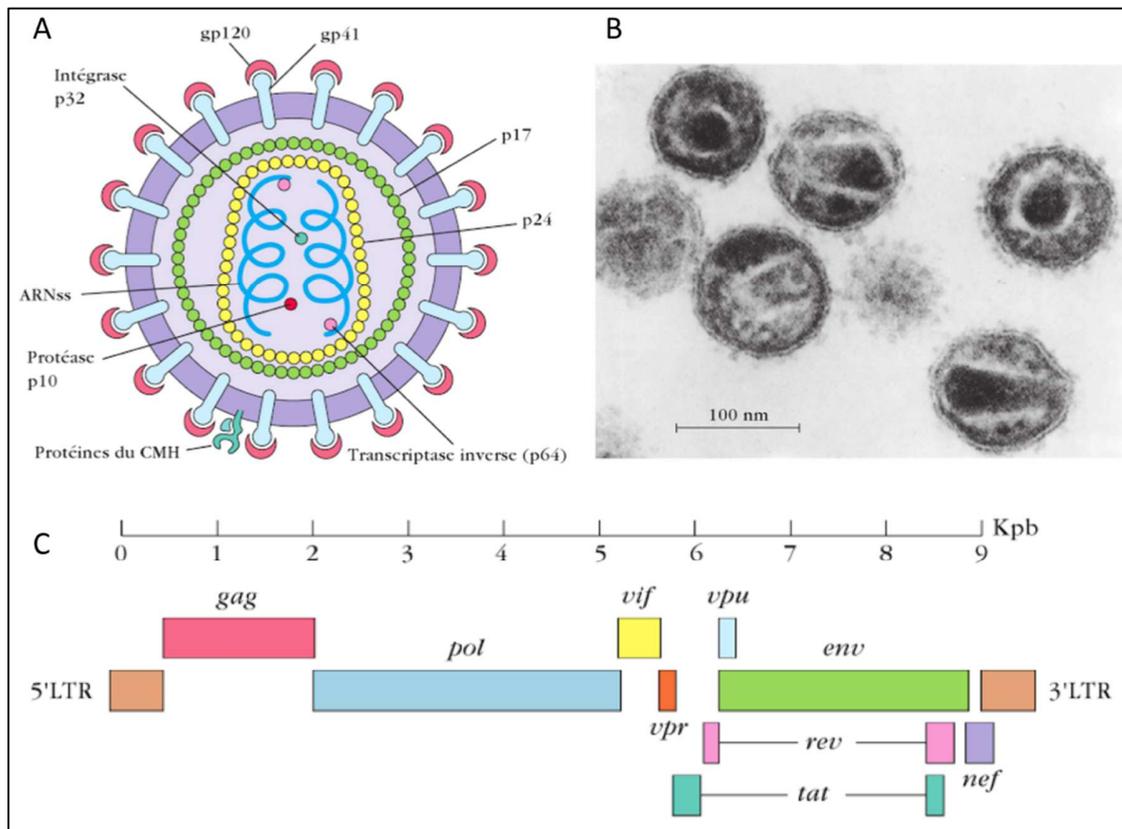


Figure 2 : Structure et organisation génétique du VIH-1. (A) Représentation schématique d'une coupe du VIH montrant les différentes glycoprotéines et acides nucléiques le constituant. (B) Micrographie électronique de virions du VIH grossis 175 000 fois³. (C) Organisation génétique des différents gènes du VIH-1. Illustrations modifiées de « *Immunologie, 7^{ème} Ed* », Kuby, Owen, Punt, Stanford, Edition DUNOD.

2) Physiopathologie et cycle viral

Le mode de transmission du VIH est principalement muqueux, même si les produits dérivés du sang ainsi que l'usage de drogues injectables via des seringues usagées ont eu un rôle épidémiologique fort. Le VIH-1 peut traverser les barrières muqueuses en passant par les cellules M, qui sont très nombreuses dans l'épithélium des amygdales et du rectum. Le virus peut aussi traverser la barrière épithéliale par un phénomène de transcytose permis par des récepteurs aux chimiokines et des syndecanes exprimés par les cellules épithéliales. Les prolongements cytoplasmiques des cellules dendritiques dans la lumière intestinale ou vaginale sont également capables de capter le virus. Les virus capturés par ces cellules dendritiques peuvent être ensuite transmis aux LT sous-

jacents, initiant l'infection. L'infection primaire des muqueuses par le VIH-1 s'établit principalement par des virus liant le CCR5, ce sont les souches nommées R5. Ce récepteur aux chimiokines est exprimé par les cellules dendritiques et les macrophages (exprimant également CD4) ainsi que les lymphocytes T CD4+ auxiliaires (LT_H). Les cellules dendritiques de Langerhans expriment DC-SIGN, une lectine de type C liant les chaînes oligosaccharidiques attachées à la gp120. L'activation de ce récepteur entraîne son internalisation associée au virus dans des vésicules non lysosomiales à pH acides, préservant le virus, et provoque la migration de la cellule de Langerhans vers les nœuds lymphatiques drainants. Dans la zone T des nœuds lymphatiques, la cellule dendritique présente le virus aux LT_H et forme une synapse immunologique où le virus infecte directement le LT_H.

L'entrée du virus dans le LT_H est effectuée par le glycoprotéine gp120 de l'enveloppe virale qui se lie au CD4 et des récepteurs aux chimiokines (CCR5 ou CXCR4), tous concentrés au niveau de la synapse immunologique (**Figure 3**). Suite à cette interaction, la gp120 change de conformation et permet à la gp41 de lier la membrane de la cellule cible et d'induire une fusion membranaire. La nucléocapside du virus entre dans le cytoplasme sous forme d'un complexe de pré-intégration. L'ARN viral est transcrit en ADNc double brin par la transcriptase inverse et le complexe migre vers le noyau. Cette étape de transcription inverse possède un taux d'erreur élevé ce qui génère de nombreuses mutations. Certaines de ces mutations entraîneront un cycle abortif, mais d'autres au contraire permettront l'échappement permanent du virus à la réponse immunitaire. L'ADNc est ensuite intégré au génome de la cellule hôte (provirus) via l'intégrase qui positionne les séquences LTR (long terminal repeat) à proximité de promoteurs forts comme celui de NF-κB. Le produit du gène *tat* (trans-activateur de la transcription) permet l'expression productive du génome proviral. Les protéines d'enveloppe gp120 et gp41 sont assemblées au niveau du réticulum endoplasmique pour arriver au niveau membranaire. La nucléocapside est assemblée dans le cytosol au niveau de la membrane. La réplication du virus va conduire à la destruction de la cellule infectée.

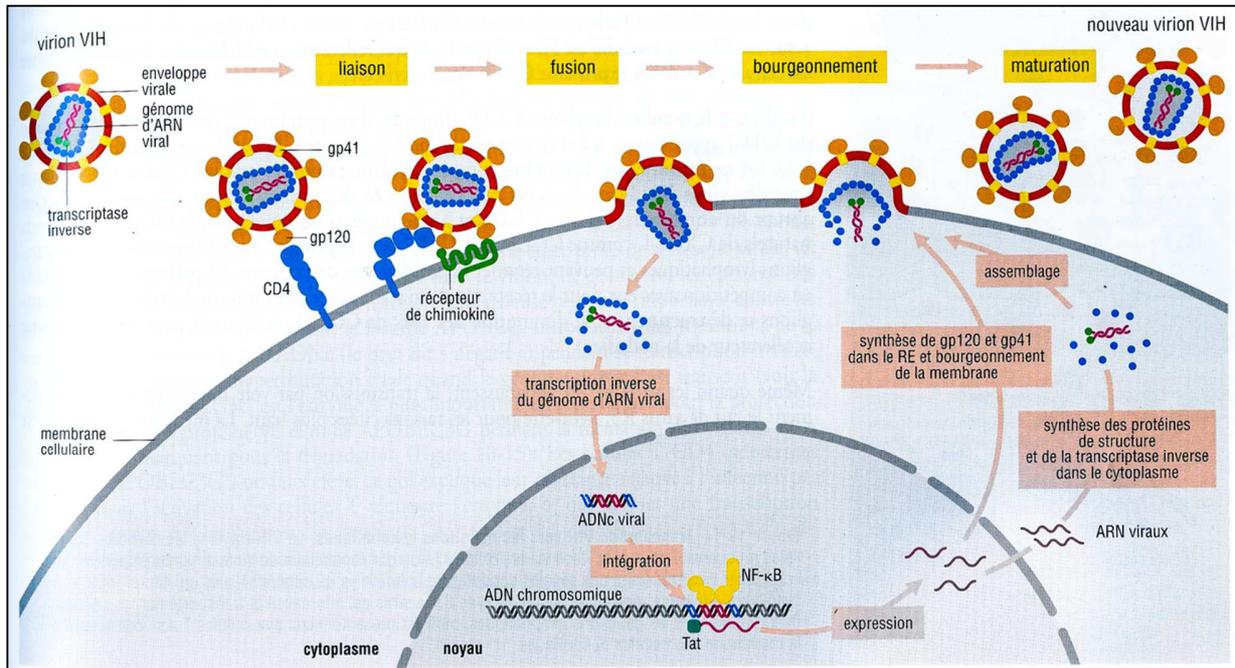


Figure 3 : Schéma simplifié du cycle viral du VIH-1. La sous-unité trimérique de la gp120 interagit avec le CD4 ce qui induit un changement de conformation et une interaction avec le récepteur aux chimiokines, aboutissant à la fusion transmembranaire. Après fusion, la capsid sert de matrice pour la transcription inverse de l'ARN viral en ADNc. Des signaux de localisation nucléaire permettent l'export du complexe nucléoprotéique vers le noyau, où le génome proviral est intégré dans l'ADN chromosomique. Les LTR permettent une intégration dans des séquences sous contrôle du facteur de transcription NF-κB, exprimé lors de l'activation cellulaire. La protéine virale régulatrice Tat augmente le niveau de transcription du provirus. Les ARN viraux sont exportés dans le cytoplasme par Rev et sont traduits et intégrés aux particules virales en formation. Illustration tirée de « *Immunité : La réponse immunitaire dans les maladies infectieuses et inflammatoires* ». A.L De Franco, M. Robertson, R.M Locksley. Edition De Boeck, 2009.

Des protéines accessoires du virus permettent un échappement à la réponse immune et une augmentation de sa virulence. La protéine Nef (facteur négatif) réprime l'expression du CMH de classe I tout en épargnant les ligands des récepteurs inhibiteurs des cellules NK (HLA-E et HLA-C). La reconnaissance par les lymphocytes T CD8⁺ spécifiques n'est donc pas permise et l'activation des cellules NK est évitée. Nef entraîne également la surexpression de Fas-L tout en supprimant la signalisation de Fas de la cellule infectée, protégeant la cellule de l'apoptose. La protéine virale Vif lie et inactive une enzyme cellulaire de modification de l'ARN qui constitue un système de défense cellulaire contre les rétrovirus. La cytidine désaminase APOBEC3G induit une transition C vers U sur le brin négatif de l'ADNc pendant la transcription inverse, provoquant une hypermutation

létale pour le virus. Cette enzyme APOBEC3G est incorporée dans la particule virale au cours de son assemblage et exerce son activité dans le complexe de pré-intégration. Néanmoins, la protéine virale Vif ubiquitine APOBEC3G ce qui provoque sa dégradation par le protéasome et empêche son intégration à la particule virale. Cette ubiquitine ligase Vif est présente dans tous les rétrovirus, sauf le virus de l'anémie infectieuse équine, mais possède une activité hôte spécifique. La protéine virale Vpr possède la capacité de bloquer le cycle cellulaire en phase G2/M, facilite l'infection des macrophages et permet le transport nucléaire du complexe de pré-intégration. Par ce mécanisme Vpr induit également l'apoptose de la cellule infectée. Enfin la protéine accessoire Vpu augmente l'efficacité de la libération des virions en inhibant la protéine cellulaire Tetherine. Ces facteurs de virulence permettent au virus d'échapper à la réponse immunitaire et de diffuser dans l'organisme.

Le récepteur CD4 est également exprimé par les monocytes circulants, les cellules dendritiques folliculaires (FDC, cellules non hématopoïétiques) et les cellules microgliales du système nerveux central. La mobilité et la diversité des cellules ciblées permettent au virus de se disséminer rapidement dans les tissus comme les organes lymphoïdes secondaires et le tractus digestif. Nous développerons le rôle des différentes cibles cellulaires du virus dans la physiopathologie et le réservoir viral dans la partie suivante.

2. Etablissement des réservoirs viraux au cours de l'infection par le VIH et son traitement

Les nouvelles combinaisons d'antirétroviraux (cART) ont permis de diminuer de manière très significative et durable la réplication virale, améliorant ainsi considérablement la vie des patients. Néanmoins, il n'existe pas aujourd'hui de traitement permettant l'éradication du virus de l'organisme. L'interruption des traitements s'accompagne dans la quasi-totalité des cas, d'un rebond de la charge virale plasmatique et d'une reprise de la progression de la maladie¹⁹. L'origine du virus après l'arrêt du traitement est probablement double : le réservoir viral et la réplication résiduelle dans des sanctuaires pharmacologiques.

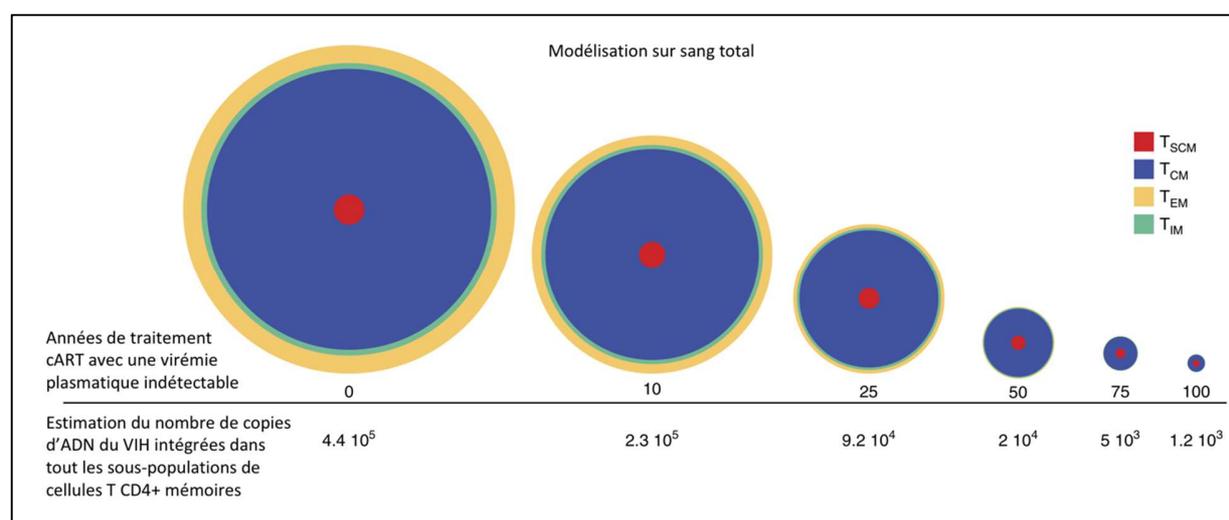


Figure 4 : Contraction lente du réservoir viral latent autour d'un groupe de cellules T CD4+, principalement T_{SCM} et T_{CM}. Représentation de la dynamique immunologique du réservoir T CD4+ latent et de la taille relative des 4 sous-populations mémoires formant ce compartiment en fonction du temps. La surface est proportionnelle au nombre de copies d'ADN du VIH intégrées dans chacune des sous-populations T CD4 mémoires dans le sang²⁰. Adapté de Jaafoura S et al. *Nat Commun.* 2014.

D'une part, le réservoir viral, constitué de LT CD4+ quiescents infectés²¹, permet au virus de persister sous une forme peu visible du système immunitaire. Les LT CD4+ mémoire centraux (T_{CM}), mémoire transitionnels (T_{TM}) et les mémoires effecteurs (T_{EM}), dans une moindre mesure, sont les principaux réservoirs dans le sang périphérique chez les patients infectés par le VIH recevant un traitement antirétroviral²⁰ (**Figure 4**). La

persistance à long terme du virus est également permise par l'infection d'une population peu différenciée de cellules mémoires possédant des capacités d'auto-renouveaulement, les LT CD4+ souche mémoires (T_{SCM})²². Cette population T_{SCM} joue un rôle de réservoir viral important chez le macaque rhésus infecté par le virus de l'immunodéficience simienne (SIV) traité par cART et chez l'homme. Les réservoirs de cellules T_{EM} et T_{TM} sont progressivement détruits par le traitement, mais le réservoir se concentre progressivement sur des populations cellulaires à longue durée de vie T_{SCM} et T_{CM} (**Figure 4**). Ainsi la taille de ce réservoir est proportionnelle à la virémie cumulée, d'où la nécessité d'initier le traitement précocement²⁰.

D'autre part, la réplication virale résiduelle dans des tissus sanctuaires pharmacologiques, inaccessibles aux traitements antirétroviraux, alimente la reprise de la réplication virale²³. Le système nerveux central, le tractus génital, les organes lymphoïdes secondaires²⁴, les tissus lymphoïdes associés au tube digestif (GALT) et le tissu adipeux²⁵ sont des réservoirs tissulaires où la distribution de la cART ne permet pas d'atteindre une concentration optimale pour la suppression et l'éradication du virus.

Nous allons maintenant étudier le rôle possible en tant que réservoir de certains organes et tissus suspectés d'être des sanctuaires pharmacologiques.

A. Tissus lymphoïdes associés au tube digestif

Dès le début de l'épidémie de SIDA, il semblait clair pour les chercheurs et les cliniciens que le tractus gastro-intestinal était le site majeur de l'infection et de la pathogénèse, quel que soit le mode d'acquisition²⁶. Avant le développement des thérapies antirétrovirales, la grande majorité des patients présentaient des complications gastro-intestinales associées à un déclin rapide de leur état de santé²⁷. Les premières études histologiques réalisées chez des patients atteints de formes chroniques et de stades SIDA montrent une détérioration de l'architecture gastro-intestinale, caractérisée par une atrophie des villosités et un infiltrat inflammatoire composé de LT CD4+²⁶. L'étude des macaques infectés par le SIV met alors en évidence que la majorité des LT CD4+ des tissus lymphoïdes associés au tube digestif (GALT) est infecté et tué dans les premières semaines de l'infection²⁸. Ces observations seront également reproduites chez l'homme²⁹ (**Figure 5**). Les GALT représentent un réservoir et une cible majeure pour le virus, en

hébergeant 60% à 80% des LT CD4⁺ du corps³⁰.

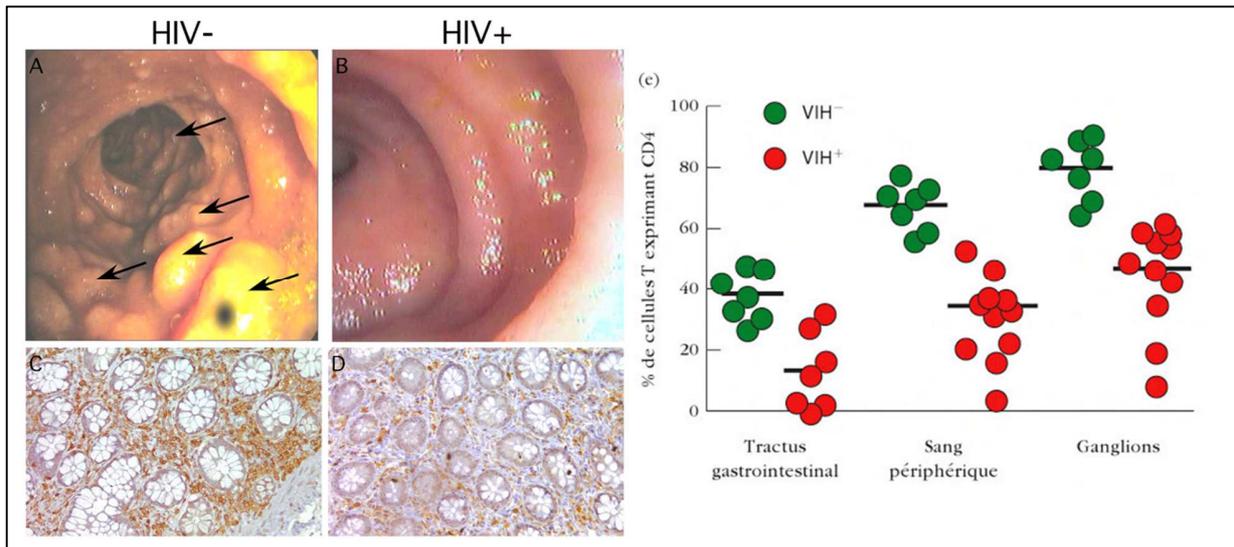


Figure 5 : Démonstration endoscopique et histologique de la déplétion en cellules T CD4⁺ du tube digestif de patients atteints de SIDA. Les images (a) et (b) montrent l'iléon terminal par endoscopie. Le patient atteint du SIDA ne présente plus de GALT visible à la surface de sa muqueuse iléale. Les images (c) et (d) montrent des coupes histologiques de GALT, issues d'une biopsie d'iléon terminal, colorée à l'hématoxyline-éosine, puis marquées pour le CD4 en immunohistochimie (couleur vermillon). La déplétion en cellules CD4⁺ iléales est très marquée chez les patients atteints de SIDA. (e) Comparaison du nombre de cellules T CD4⁺ dans des échantillons de tube digestif, de sang périphérique et de ganglions lymphatiques obtenues chez des individus séropositifs et sains²⁹. Adapté de Brenchley JM et al. *J Exp Med*. 2004.

Le SIV/VIH infecte de façon préférentielle des LT_{H17}, une population auxiliaire productrice d'IL-22 et IL-17 permettant le maintien de l'intégrité des jonctions serrées de l'épithélium, la défense contre les infections bactériennes et fongiques³¹. Les LT_{H17} se développent en équilibre avec les LT_{reg} dans les GALT et la *lamina propria*³². Physiologiquement il existe une balance entre réaction pro-inflammatoire/renouvellement de l'épithélium et la tolérance du microbiote (anciennement appelée flore microbienne), qui préserve notre interaction fonctionnelle avec le microbiote. Le modèle actuel postule, que au cours de la phase aiguë de l'infection par le VIH, la perturbation de la balance LT_{H17} / LT_{reg} est à l'origine de l'altération de la barrière gastro-intestinale. Le microbiote est alors capable de traverser l'épithélium intestinal pour atteindre la *lamina propria* par un mécanisme appelé translocation bactérienne³². L'exposition continue des cellules présentatrices d'antigène

de la *lamina propria* induit une activation immunitaire systémique, qui recrute, active des LT CD4⁺ et donc alimente la réplication virale³³.

La cART ne permet pas de résoudre l'entéropathie et de restaurer la structure des GALT, malgré le contrôle de l'infection³⁴. Un pool de cellules, infectées de façon latente et active, continue de perpétuer les dysfonctions de l'immunité mucoale observée chez les patients²⁶. Les lymphocytes T infectés de façon latente dans ces tissus forment un réservoir pour le virus. Il semble que ce réservoir alimente le sang périphérique en virus et en cellules infectés, y compris chez les patients sous ART³⁵. La distribution du réservoir le long du tube digestif n'est pas homogène. Elle dépend notamment de l'expression de transporteurs et de cytochromes P450 modifiant la biodisponibilité de la cART dans le tube digestif³⁶ ²³. Les GALT sont donc des organes lymphoïdes secondaires sanctuaires pharmacologiques pour le virus tout comme les nœuds lymphatiques que nous allons maintenant aborder.

B. Nœuds lymphatiques

Dans cette partie nous nous focaliserons sur les nœuds lymphatiques, mais ce qui est décrit ici est généralisable aux autres organes lymphoïdes secondaires. Les nœuds lymphatiques sont des organes lymphoïdes secondaires à partir desquels le VIH fut pour la première fois isolé et cultivé ³. L'infection par le VIH provoque une adénopathie correspondant à une hypertrophie folliculaire, c'est à dire une augmentation de taille des follicules avec la formation de centres germinatifs, due à une multiplication accrue des lymphocytes B (LB)³⁷. Ce phénomène reflète une activation polyclonale des LB, et se traduit notamment par l'hypergammaglobulinémie, identifié très précocement lors de l'infection. Durant la phase aiguë, la zone paracorticale augmente également de taille du fait de l'expansion des LT CD8⁺, ce qui participe à l'adénopathie³⁷. Au cours de l'infection l'architecture des nœuds lymphatiques est progressivement perdue avec une involution des follicules, une disparition des centres germinatifs et des changements du paracortex et des sinus sous-corticaux. Cette modification structurale s'explique notamment par la perte des LT CD4⁺, mais également par la disparition des cellules dendritiques folliculaires (FDC)³⁸. Les FDC sont des cellules d'origine non hématopoïétique qui structurent les follicules secondaires et leurs centres germinatifs en sécrétant notamment la chimiokine CXCL13³⁸. Les FDC sont capables de capturer les antigènes via des récepteurs au

complément et des récepteurs Fc, pour les présenter aux LB. Par ce mécanisme les FDC participent, en association avec les LT CD4+ folliculaires (T_{FH}), au processus d'hypermutation somatique, de sélection et de différenciation en cellule mémoire des LB. Les FDC ne sont pas infectées par le virus mais jouent le rôle de réservoir en capturant les virons à leur surface via le récepteur au complément³⁹. Les T_{FH} du centre germinatif seront infectés au contact des FDC et des LB, porteurs de particules virales à leur surface sous forme de complexe immun ou liés aux molécules du complément.

En absence de traitement, les nœuds lymphatiques sont des sites de réplication majeurs du virus et ils ont également été identifiés comme des sanctuaires pharmacologiques. Les macaques cynomolgus infectés par le SIV et recevant un traitement ART montrent une réplication virale persistante dans les nœuds lymphatiques, malgré une bonne suppression de la réplication dans le sang²⁴. Le virus a été trouvé dans de nombreux nœuds lymphatiques de macaques infectés sous cART : mésentérique, axillaire, inguinal, iliac et cervical²³. De plus, une étude menée sur des macaques infectés par le SIV et traités par zidovudine/lamivudine/indinavir montre que la lamivudine est en faible concentration dans ce compartiment²⁴. Cette faible concentration est également corrélée avec la charge virale dans les nœuds lymphatiques. Il y a donc une mauvaise diffusion de la cART dans les nœuds lymphatiques, qui atteint une concentration non optimale.

En absence de traitement, les T_{FH} représentent le site majeur de réplication virale, ainsi 60-75% des cellules productrices de virus sont localisées dans les follicules des nœuds lymphatiques⁴⁰. Les LT_{FH} sont des lymphocytes T auxiliaires participant à la commutation isotypique et la maturation d'affinité des lymphocytes B dans les follicules des organes lymphoïdes secondaires³⁰. Les T_{FH} représentent un réservoir cellulaire latent lors de l'infection des macaques rhésus par le SIV³⁹, et chez des patients infectés par le VIH sous cART⁴⁰. Ce rôle de réservoir s'explique, d'une part, par leur localisation histologique et, d'autre part, par leur permissivité au virus. Ainsi, dans les follicules, le gradient de chimiokines ne permet pas aux LT CD8+ cytotoxiques (LTC) de migrer et de tuer ces cellules infectées, conférant une protection des LT_{FH} infectés par le virus⁴¹. Chez le macaque, peu de LTC spécifiques du SIV expriment le récepteur de migration CXCR5 en absence de CCR7 (rétention extrafolliculaire), les empêchant d'accéder au follicule⁴². De

plus, les LT_{FH} sont très permissives au virus en exprimant CXCR4, CCR5 et la protéine anti-apoptotique Bcl-2, qui augmente la production du virus⁴³. Dans les premières phases de l'infection les populations LT_{FH} sont en expansion en parallèle des cellules des follicules. La cART entraîne une diminution relative du nombre de LT_{FH}, mais celui-ci reste plus élevé que celle d'individus sains. Le traitement ne permet pas de rétablir les dysfonctions des LT_{FH} provoquant une altération de la réponse humorale et vaccinale⁴⁴. D'un point de vue fonctionnel, les LT_{FH} sécrètent moins d'IL-21 et IL-4 chez les patients infectés pouvant altérer la maturation d'affinité⁴⁴.

Les FDC jouent également le rôle de réservoir au cours du traitement par la capture des virions ciblés par des anticorps, via les récepteurs au complément et au Fc³⁸. Elles peuvent capturer et maintenir des particules virales infectantes pendant des mois, créant un répertoire de la diversité et de l'évolution génétique de la quasi-espèce virale³⁸. Les nœuds lymphatiques sont donc des compartiments sanctuaires, où une réplication résiduelle se produit malgré la mise en place de la cART, participant donc à la progression de la maladie.

C. Système nerveux central

Très tôt des troubles neurologiques ont été associés à l'infection par le VIH-1. Entre 40% et 70% des individus infectés présentent des troubles du système nerveux central (SNC) et du système nerveux périphérique (SNP)⁴⁵. De nombreuses complications neurologiques ont été caractérisées : la démence associée au SIDA, l'encéphalopathie due au SIDA, la démence associée au VIH (HAD), le neuro-SIDA et plus récemment les troubles neurocognitifs associés au VIH (HAND)⁴⁶. Les preuves de l'infection précoce du SNC par le VIH s'accumulent. L'utilisation de la cART a permis de diminuer la prévalence de la démence associée au VIH. Ces patients présentaient une déficience sévère des fonctions motrices, une incapacité à réaliser des tâches complexes ou encore une perte d'initiative⁴⁷. Néanmoins, l'incidence des troubles cognitifs modérés dû au VIH persiste, avec un impact significatif sur la mortalité et la qualité de vie des patients⁴⁵. De plus, les évidences post-mortem d'encéphalopathies dues au VIH persistent malgré la cART. L'existence de la barrière hémato-encéphalique fait du SNC un compartiment relativement imperméable à la cART⁴⁸, formant un sanctuaire pharmacologique pour le

virus et provoquant les HAND⁴⁶. De nombreux traitements antirétroviraux, dont les inhibiteurs de protéase, sont des substrats de transporteur de la barrière hémato-encéphalique comme la P-glycoprotéine⁴⁹. Localisées sur la surface des cellules endothéliales cérébrales, les P-glycoprotéines pompent hors du cerveau et bloquent de nombreuses molécules thérapeutiques. Par l'inflammation qu'il induit, le VIH-1 augmente l'activité des P-glycoprotéines de la barrière hémato-encéphalique⁵⁰. Les traitements antirétroviraux ne peuvent donc pas atteindre une dose thérapeutique dans le SNC.

Le modèle communément admis de l'infection du SNC est celui de « l'hypothèse du cheval de Troie »⁵¹. Le virus parvient à franchir la barrière hémato-encéphalique via des monocytes et des LT CD4⁺ infectés, qui circulent du sang vers le SNC où ils propagent l'infection⁴⁵ (**Figure 6**). Un phénomène de transcytose via les cellules endothéliales se produit également, mais son implication dans l'infection du SNC semble plus minime que la transmission cellulaire⁴⁶. Dans le cerveau, les macrophages péri-vasculaires ainsi que la microglie sont productivement infectés par le VIH⁵². L'infection dans le SNC des cellules résidentes ainsi que des cellules migrantes provoquent une inflammation et la libération de cytokines pro-inflammatoires (TNF et IL-1 β)⁵³, qui en retour activent la microglie et les astrocytes⁵² (**Figure 6**). La microglie et les macrophages péri-vasculaires sont les principaux acteurs de la neuro-inflammation dans l'infection par le VIH. Ils libèrent des facteurs neurotoxiques (acides aminés activateurs, cytokines) entraînant une dysfonction et une mort neuronale⁴⁶. De plus, les protéines virales sécrétées par les cellules infectées agissent directement sur les neurones en perturbant leur activité⁵⁴ (**Figure 6**). Les LT infectés, qui ont pénétré dans le SNC, transmettent également le virus aux astrocytes, exprimant CCR5 et CXCR4, via la formation de synapses virologiques. Les astrocytes répliquent faiblement le virus, mais ils provoquent des modifications fonctionnelles de cette population de cellules gliales⁵⁵. La barrière hémato-encéphalique, ainsi que les fonctions nutritives et régulatrices des astrocytes sont alors altérées. Le métabolisme et la fonction neuronale est modifié, expliquant en partie le développement de troubles neurocognitifs. L'inflammation générée par la multiplication virale provoque la libération de chimiokines, qui mobilisent et activent des monocytes et des LT CD4 circulant. Ces cellules seront à leur tour cibles du virus, générant un phénomène d'amplification en boucle, entretenant l'inflammation. Les dégâts provoqués par l'inflammation sont visualisables à l'imagerie cérébrale. Chez les individus infectés par le VIH et suspects de

troubles neurocognitifs on observe une atteinte de la matière grise et des régions sous-corticales ainsi qu'une atrophie cérébrale associée avec un élargissement ventriculaire⁵⁶
⁴⁶ 57. Le SNC est donc un sanctuaire pharmacologique participant à la persistance virale et l'infection persistante à encore un impact clinique majeur chez les patients traités.

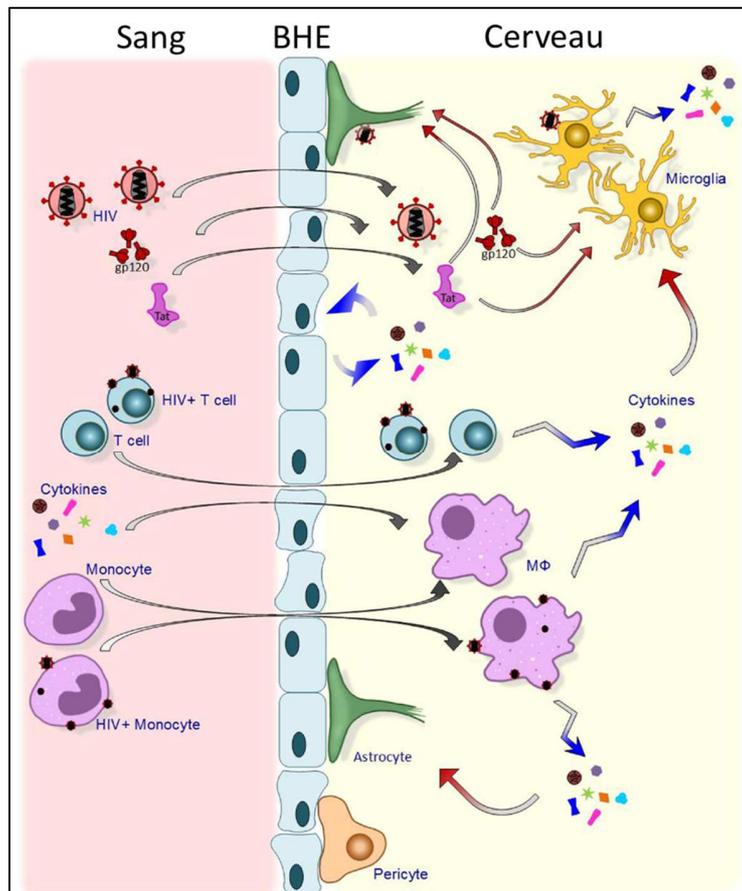


Figure 6 : Migration cellulaire et virale depuis le sang périphérique vers le cerveau au cours de l'infection par le VIH. Le VIH peut infiltrer le SNC par de nombreux moyens dont des cellules infectées traversant la barrière hémato-encéphalique (BHE) et par transcytose. Le VIH est capable d'infecter la microglie et les astrocytes, activant ces populations cérébrales qui vont libérer de nombreuses cytokines pro-inflammatoires. Cette inflammation entraîne une mort neuronale à l'origine de maladies neurodégénératives. Dans un second temps, les monocytes et les cellules T infectés migrent dans le cerveau, se transformant en macrophages et cellules T activées du fait de l'environnement inflammatoire. La libération de cytokines inflammatoires par les macrophages et les cellules T activées amplifient l'inflammation cérébrale et activent d'autant plus la microglie et les astrocytes. L'inflammation cérébrale est également alimentée par les cytokines circulantes et par l'activation des cellules endothéliales de la BHE⁴⁶. Adapté de Hong S, Banks WA. *Brain Behav Immun.* 2015.

D. Le tractus génital

La transmission sexuelle du VIH reste actuellement la voie d'acquisition la plus fréquente⁵⁸. Le tractus génital de la femme est complexe d'un point de vue immunologique et microbien. Il comprend deux compartiments, le tractus génital inférieur et supérieur, anatomiquement séparés et avec des environnements différents. Lors du traitement cART, une réplication virale est identifiée dans le liquide cervico-vaginal associée une inflammation locale, malgré des niveaux indétectables d'ARN viral dans le plasma⁵⁹. Cette inflammation locale semble se mettre en place suivant des interactions complexes entre hormones sexuelles, immunité mucosale et microbiote du tractus génital. L'augmentation de l'inflammation génitale permet le recrutement, l'activation de cellules immunitaires cibles du virus et assure le maintien d'un réservoir de cellules infectées de façon latentes⁶⁰. Les macrophages du vagin et de l'exocol expriment plus le récepteur CD4, le CCR5 et le CXCR4 comparé aux macrophages résidents de l'intestin⁶¹. Il y a ainsi une forte proportion de cellules cibles et réservoirs dans le vagin et l'exocol. Les monocytes, les macrophages et les lymphocytes sont considérés par certains auteurs comme les réservoirs principaux dans le tractus génital de la femme sous cART⁶². La dispersion de ces cellules dans la muqueuse cervico-vaginale alimente ensuite les sécrétions du col et du vagin en cellules infectées. Dans un groupe de patientes suivi longitudinalement recevant la cART, le taux d'ARN VIH-1 dans ces sécrétions est corrélé à la virémie plasmatique⁵⁹. Néanmoins, le taux d'ADN proviral dans les sécrétions cervico-vaginales est plus important que celui des cellules mononuclées sanguines dans le même groupe de patientes⁵⁹. Ainsi la cART ne permet pas la clairance du réservoir cellulaire dans la moitié des femmes suivies, même après 6 mois de traitement⁵⁹. Mais il est encore nécessaire de caractériser l'impact du cycle menstruel et de la régénération de l'endomètre, avec l'enrichissement en cellules immunitaires qui l'accompagne, pour comprendre la dynamique du réservoir viral dans ce compartiment.

Le VIH est présent dans le sperme sous forme de particules virales et de cellules infectées, dont on pensait qu'elles provenaient du sang. Mais les souches de VIH présentes dans le sperme évoluent séparément de celles du sang et des autres compartiments⁶³. L'appareil reproducteur de l'homme constitue donc un compartiment distinct du sang, qui produit des particules virales sous une pression de sélection qui lui

est propre. Le sperme est composé de cellules et de sécrétions provenant des testicules, de l'épididyme, la prostate, les vésicules séminales et des glandes bulbo-urétrales. Les lymphocytes et les macrophages constituant le sperme ne sont pas les seuls producteurs des particules virales détectées dans le liquide séminal. Il est actuellement admis que les spermatozoïdes ne sont pas productivement infectés par le virus mais pourraient jouer le rôle de transporteur passifs des virions produits dans les testicules et l'épididyme⁶⁴. La cART permet de réduire la charge virale dans le sang et le liquide séminal, mais une faible virémie est détectable dans le liquide séminale et des cellules infectées par le VIH peuvent toujours être récupérées dans le sperme⁶⁵. L'existence de la barrière hémato-testiculaire et de pompes à efflux exprimées par un grand nombre de cellules testiculaires restreint l'accès des traitements à cet organe⁶⁴. L'infection des macaques cynomolgus par le SIV montre qu'une infection productive a lieu dès la phase aiguë de l'infection⁶⁶. Les cellules infectées dans l'interstitium testiculaire sont principalement des lymphocytes et des macrophages, mais certaines études rapportent une infection des cellules germinales⁶⁶. Le VIH est également présent dans les glandes accessoires et des études montrent que le HIV/SIV est présent dans des cellules immunitaires infiltrant l'épididyme, la prostate et la vésicule séminale d'hommes ⁶⁷ ⁶⁷ et de macaques ⁶⁸ aux stades SIDA. Les cellules immunitaires infectées sont principalement localisées dans le stroma et dans l'épithélium pour l'épididyme. L'infection chronique des glandes accessoires est associée à un infiltrat de cellules T et une production de cytokines inflammatoires⁶⁶. La prostate et les vésicules séminales montrent un niveau d'infection supérieur à l'épididyme et le testicule. Sachant que ces deux glandes produisent 90% du liquide séminal, la prostate et les vésicules séminales sont les plus grandes sources de virus dans le sperme⁶⁴. De façon intéressante la prostate est préférentiellement infectée par les souche R5 du VIH, transmises sexuellement, en comparaison aux souches X4⁶⁹. Il semble que les testicules puissent former un sanctuaire pharmacologique. Aucune étude référencée ne semble avoir déterminé la concentration des différents traitements antirétroviraux dans l'appareil reproducteur de l'homme. Les glandes accessoires semblent participer au réservoir viral mais des études supplémentaires sont nécessaires pour mieux les caractériser. La pénétration de la cART n'est pas uniforme dans le tractus génital faisant donc de cet appareil un sanctuaire pharmacologique. Ainsi la concentration des inhibiteurs non nucléosidiques de la transcriptase inverse (NNRTI) et des inhibiteurs de protéases est

plus faible dans le tractus génital de l'homme et de la femme comparé au plasma. Par contre les concentrations d'inhibiteurs nucléosidiques de la transcriptase inverse (NRTI) sont plus fortes⁷⁰. Dans la plupart des études, les concentrations des traitements dans le liquide séminal et cervico-vaginal sont utilisées pour estimer les concentrations tissulaires ce qui induit un biais dans l'analyse des réservoirs. Le tractus génital supérieur de la femme n'est donc pas accessible par cette approche.

E. Le tissu adipeux

Une étude récente (*Damouche et al. PLoS Pathog. 2015*) fait l'hypothèse que le tissu adipeux participe à l'activation chronique du système immunitaire et à la persistance virale²⁵. Lors de l'infection par le VIH des altérations métaboliques ainsi que des niveaux élevés de cytokines pro-inflammatoires sont présentes dans le tissu adipeux⁷¹. Le tissu adipeux est composé d'adipocytes et d'une fraction vasculaire stromale (SVF), cette dernière contenant des lymphocytes T CD4⁺, T CD8⁺ et des macrophages. Dans cette étude, ils différencient le tissu adipeux sous-cutané (SCAT) du tissu adipeux viscéral (VAT) du fait de leurs différences en termes de fonction métabolique et d'infiltrat immunitaire. Le tissu adipeux de macaques infectés par le SIV contient plus de macrophages, des LT CD4⁺ et LT CD8⁺ et ils montrent un profil plus activé comparé au groupe témoin. De plus, le pourcentage relatif de cellules T CD4⁺ est significativement diminué chez les macaques infectés, alors que le pourcentage de cellules T CD8⁺ est lui plus élevé. Chez les macaques infectés, la présence de cellules productrices de virus a été confirmée par la détection d'ARN viral dans ce tissu. Il est également possible de réactiver les LT CD4⁺ du tissu adipeux, produisant alors des particules virales (**Figure 7**).

Des résultats similaires ont été observés chez des patients sous cART et ayant subi une chirurgie viscérale, qui a permis de collecter les échantillons. Chez ces patients, la fraction vasculaire stromale est positive pour l'ADN et l'ARN du VIH. Le tissu adipeux pourrait donc représenter un réservoir chez les patients recevant la cART en hébergeant des cellules infectées de façon latente, et également un site de réplication résiduelle. Deux mécanismes semblent empêcher la cART d'être efficace dans le tissu adipeux : le tissu adipeux est peu accessible à la cART ⁷² et la séquestration des traitements dans des gouttelettes lipidiques⁷³. Le tissu adipeux est donc un nouveau candidat de réservoir viral

ou de sanctuaire participant à l'échec de l'éradication par les traitements antirétroviraux.

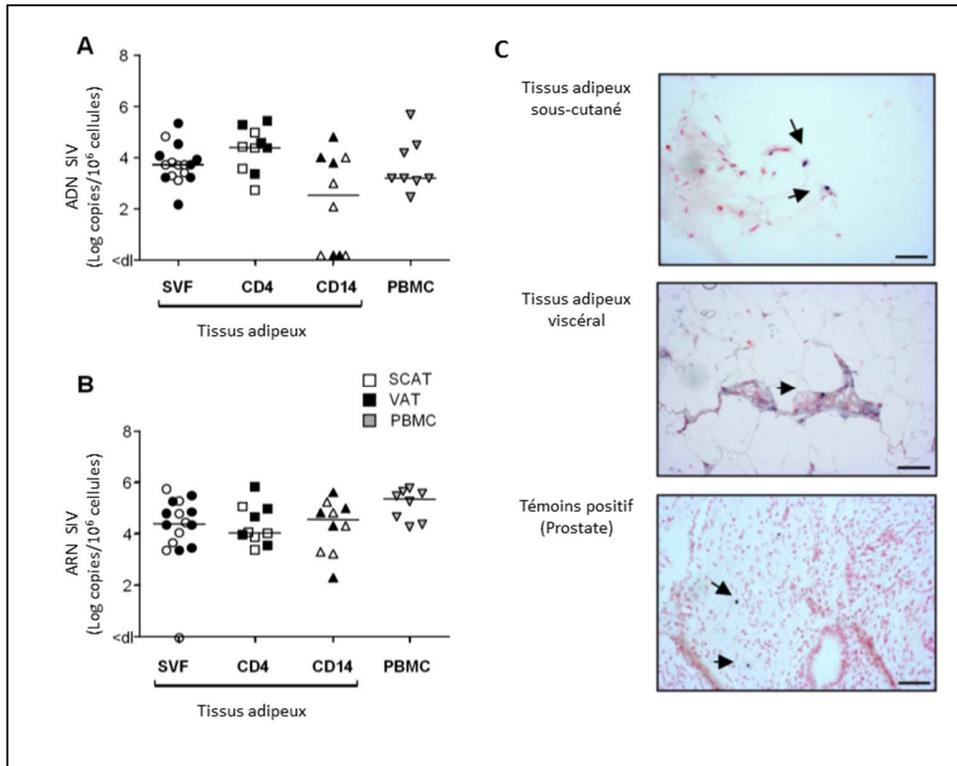


Figure 7 : Quantification de l'ADN et de l'ARN du SIV dans les cellules du tissu adipeux. (A et B) quantification de l'ADN et de l'ARN du SIV réalisée sur la fraction vasculaire stromale (SVF), les cellules T CD4⁺ et les cellules CD14⁺ après tri cellulaire, et les cellules mononuclées du sang périphérique (PBMC) de macaques infectés par le SIV. (C) Hybridation *in situ* pour l'ARN du SIV réalisée sur le tissu adipeux sous-cutané (SCAT) et le tissu adipeux viscéral (VAT) provenant d'un macaque infecté. Le tissu prostatique d'un individu infecté par le SIV a été utilisé comme témoin positif. Bar d'échelle : 50 μ m. La fraction SVF provenant de macaques infectés chroniquement contient des cellules T CD4⁺ et des cellules CD14⁺ infectées par le SIV. La présence d'ARN du SIV suggère qu'il y a une production virale dans les cellules immunitaires du tissu adipeux. Adapté de Damouche et al. *PLoS Pathog.* 2015.

F. Macrophages

Les macrophages sont également permissifs au virus et maintiennent la réplication virale au niveau tissulaire. La localisation anatomique des macrophages et la présence de pompes à efflux diminuant les concentrations intracellulaires des traitements antirétroviraux⁷⁴, fait de cette population myéloïde un acteur clé de la persistance virale dans les sanctuaires pharmacologiques. Il semble que les macrophages soient moins susceptibles à l'effet cytopathique du VIH. L'assemblage du virus se produit dans le compartiment intracellulaire contenant les molécules du CMH de classe II et libère les virions après fusion de ces vésicules avec la membrane. Ainsi, une hypothèse est que les protéines virales ne sont pas exposées à la surface membranaire du macrophage, le rendant moins susceptible aux lymphocytes T cytotoxiques. Les macrophages s'accumulent notamment dans l'intestin durant l'infection, montrent un profil activé, et libèrent des cytokines pro-inflammatoires (IFN- α et TNF- α), qui participent à la mise en place d'une inflammation locale et systémique⁷⁵ alimentant l'activation des LT et donc la réplication virale.

G. Bilan

Les sanctuaires pharmacologiques sont donc à l'origine d'une persistance virale et d'une réplication résiduelle dans de nombreux organes et cellules, où les traitements n'ont pas accès. L'absence d'éradication du virus est en partie responsable d'une inflammation chronique délétère chez les patients infectés par le VIH. Certains auteurs définissent même l'infection par le VIH comme une maladie inflammatoire chronique, au cours de laquelle des dysfonctions du système immunitaire sont à l'origine de comorbidités.

3. Inflammation systémique au cours de l'infection par le VIH

A. Le VIH : une maladie inflammatoire chronique

La persistance de l'inflammation est une des caractéristiques majeures de l'infection par le VIH, y compris chez les individus bénéficiant d'un traitement⁷⁶. Les adultes infectés par le VIH ont un risque plus élevé de développer des maladies non associées au SIDA. Les maladies cardiovasculaires, neurocognitives, hépatiques, rénales, l'ostéoporose, et certains cancers sont ainsi plus fréquents chez les personnes infectées par le VIH comparé aux individus sains du même âge⁷⁷. Comme la plupart de ces maladies sont associées au vieillissement, l'hypothèse que le VIH induise un vieillissement accéléré a été explorée¹⁵. De nombreux facteurs contribuent au développement de ces maladies : toxicité des traitements antirétroviraux, facteurs de risques divers (obésité, hypertension et consommation de drogue), et surtout le dysfonctionnement du système immunitaire associé à une inflammation excessive. La fréquence des cellules T activées, des monocytes inflammatoires et des cytokines inflammatoires est plus élevée chez les patients infectés par le VIH non traités, et traités que dans une population témoin d'âge équivalent⁷⁸. La persistance de l'inflammation systémique est également corrélée à un état d'hypercoagulabilité observé chez ces patients⁷⁹. Le modèle actuel postule ainsi qu'un état inflammatoire de faible intensité mais persistant, même après contrôle par des antirétroviraux, provoque un dysfonctionnement vasculaire et des altérations de l'état de coagulation, qui finissent par induire des maladies sur un ou plusieurs organes⁷⁶.

L'inflammation chronique résulte de la persistance de cellules infectées⁸⁰, d'une translocation microbienne excessive au niveau de l'intestin⁸¹, de la réplication d'autres virus (Cytomégalovirus, co-infections hépatites virales)⁷⁶ et probablement d'autres mécanismes⁷⁶ encore non élucidés (**Figure 1**).

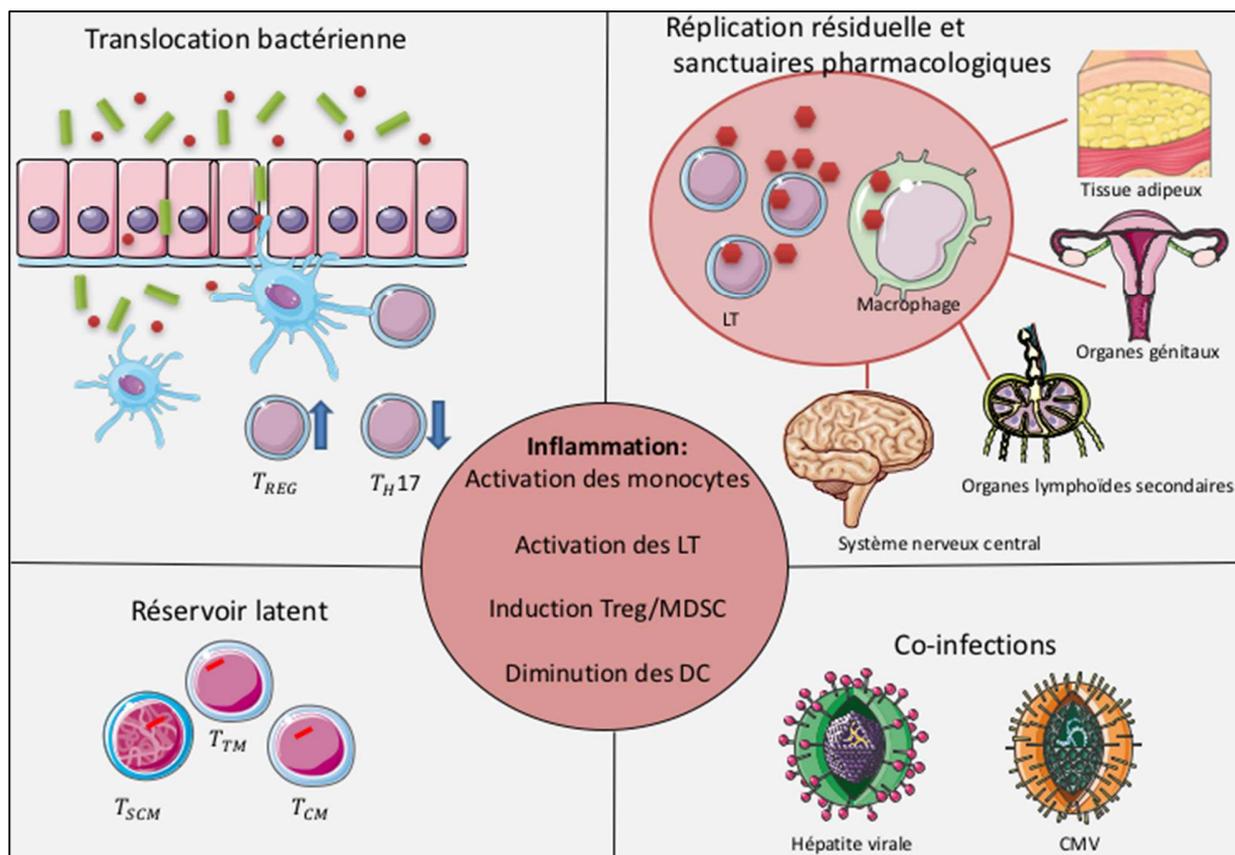


Figure 8 : Principales causes de la persistance de l'inflammation au cours de l'infection par le VIH. Malgré la mise en place de la cART, l'inflammation chronique persiste chez les patients. Celle-ci est principalement alimentée par la translocation microbienne, la réplication résiduelle dans les sanctuaires pharmacologiques, le réservoir cellulaire latent et les co-infections. Adapté de Younas, M. et al. HIV Medicine (2015).

B. Translocation microbienne, immunité innée et inflammation chronique

L'altération de la muqueuse intestinale conduisant à la translocation microbienne joue un rôle majeur dans l'inflammation chronique⁷⁶. La translocation microbienne correspond au passage de produits microbiens depuis la lumière intestinale vers la circulation systémique, en absence d'une bactériémie. Les produits bactériens et fongiques comprennent le peptidoglycane, l'acide lipotéichoïque, le lipopolysaccharide (LPS), la flagelline, l'ADN ribosomal et l'ADN contenant des CpG non méthylés³³. Ce sont généralement les produits bactériens qui sont étudiés dans ce contexte, c'est la raison

pour laquelle il est souvent fait mention de translocation bactérienne. Cette translocation bactérienne systémique observée chez les patients infectés est due à la perte des T_H17 , la destruction de la barrière épithéliale intestinale et à la diminution de la clairance des produits bactériens par phagocytose³³.

Les dommages du tractus intestinal ont été décrits très tôt dans l'épidémie du VIH, avec des patients présentant une diarrhée et une perte de poids du fait d'un syndrome de malabsorption. De façon directe (protéines virales) et indirecte ($TNF\alpha$ et $IFN\gamma$), le virus entraîne une perte des entérocytes par apoptose et une rupture des jonctions serrées amenant à une augmentation de perméabilité aux produits microbiens³³ (**Figure 9**). Les biopsies jéjunales révèlent une atrophie partielle des villosités avec une hyperplasie des cryptes. Ils observent une diminution des plasmocytes producteurs d'immunoglobuline A (IgA), en corrélation avec des dysfonctionnements des cellules B et la diminution des concentrations en IgA dans la lumière intestinale^{82 83}.

La balance entre lymphocytes T_{REG} et T_H17 au niveau des tissus lymphoïdes associés à l'intestin est bouleversée et amplifie l'activation du système immunitaire⁸⁴ (**Figure 9**). Cet équilibre, essentiel pour maintenir l'intégrité de la barrière intestinale, est rompu et alimente une translocation bactérienne, qui persiste sous traitement cART⁸⁵. Les T_H17 expriment les corécepteurs CCR5 et CCR6 (marqueur de migration intestinale) et sont ainsi infectés de façon préférentielle par le virus. Les T_H17 favorisent le recrutement des neutrophiles et la production de peptides antimicrobiens comme les défensines, et sont donc supposés contrôler les bactéries extracellulaires et les champignons. Ainsi la perte des cellules T_H17 semble entraîner une prolifération microbienne⁸⁶. Les cellules T_H17 produisent de l'IL-22 qui augmente la régénération épithéliale. La perte de cette population cellulaire dérègle la réparation de la muqueuse intestinale et donc augmente la perméabilité et la translocation bactérienne. Une étude montre qu'une faible fréquence de T_H17 dans des biopsies du colon sigmoïde de patients infectés par le VIH est corrélée avec un niveau de LPS plasmatique plus élevé, qui à son tour est corrélé à une augmentation du réservoir proviral dans l'intestin⁸⁷. Déplétion des T_H17 intestinaux, translocation bactérienne et réservoir viral sont donc intimement liés.

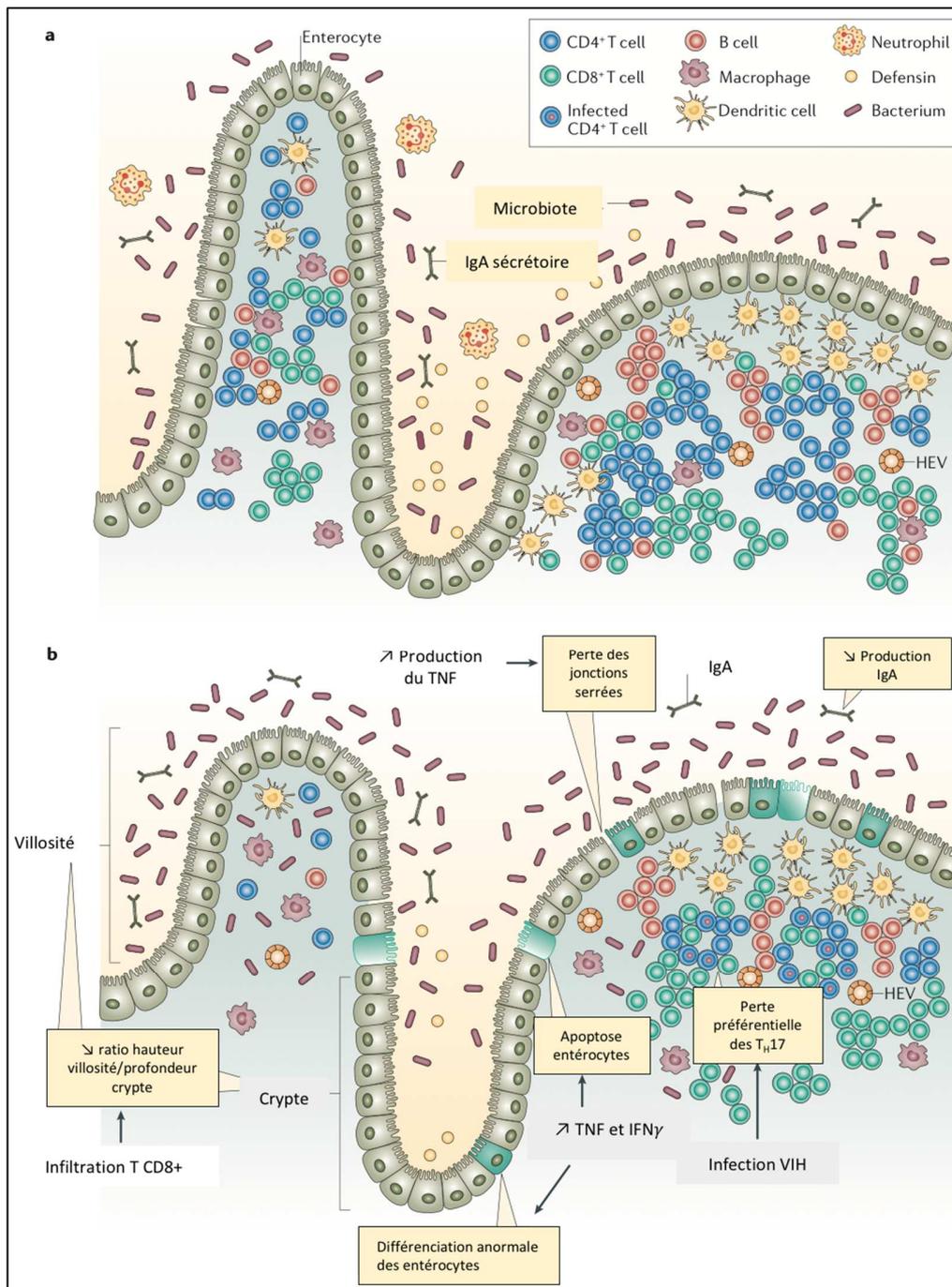


Figure 9 : Modifications de l'épithélium intestinal durant l'infection du VIH ³³. (a) Epithélium intestinal chez un individu sain. La paroi continue d'entérocytes ainsi que les jonctions serrées empêchent la translocation des bactéries commensales depuis la lumière intestinale vers la paroi intestinale. Les neutrophiles (recrutés par les cellules T $_H$ 17 dans les GALT), les défensines (produites par les T $_H$ 17) and les immunoglobulines A sécrétoires (IgAs) maintiennent le contrôle de la croissance du microbiote.

(b) Epithélium intestinal chez un individu infecté par le VIH. La hauteur des villosités intestinales diminue alors que la profondeur des cryptes augmente chez les individus infectés par le VIH, avec une infiltration de cellules T CD8+. La diminution du ratio hauteur

des villosités/profondeur des cryptes est certainement le résultat d'une différenciation anormale et une apoptose des entérocytes, entraînant une augmentation du TNF α et IFN γ . En retour le TNF α entraîne une apoptose des entérocytes. Le dysfonctionnement des cellules B contribue à la diminution de la concentration en IgA dans la lumière, et l'infection des cellules T CD4+ (T_H17 principalement) entraîne une destruction de celle-ci dans le GALT. Le bas niveau d'IgA et la perte des cellules T_H17 participe à la prolifération du microbiote, contribuant à la translocation. *Adapté de Sandler NG, Douek DC. Nat Rev Microbiol. 2012.*

Les produits microbiens sont ensuite drainés depuis l'intestin par les veines mésentériques qui se déversent dans la veine porte pour finir par atteindre le foie. Dans cet organe filtre, les cellules de Kupffer (macrophages hépatiques) et les hépatocytes, reconnaissent ces produits via leurs TLRs et éliminent la majorité du LPS circulant⁸⁸. Par analogie, chez les patients infectés par les virus de l'hépatite B ou C, on observe une augmentation de la translocation bactérienne et une activation des monocytes par le LPS, qui est prédictive d'une évolution vers une cirrhose⁸⁹. L'hypertension portale, la fibrose hépatique et la diminution de la synthèse protéique par le foie ont été décrit chez des patients infectés par le VIH, ce qui suggère que le VIH est lui aussi capable de modifier la fonction et l'architecture hépatique⁹⁰. Ces altérations diminuent la filtration hépatique du LPS, augmentant sa concentration plasmatique. La translocation excessive des produits bactériens conduit à terme à une amplification des lésions hépatiques et une augmentation du LPS plasmatique, qui active notamment les monocytes via le TLR4⁸⁵. Ainsi, les patients virémiques non traités montrent une augmentation des populations de monocytes inflammatoires CD14- CD16+, productrices de TNF α en réponse au LPS⁹¹. L'activation chronique des monocytes et l'altération de la synthèse protéique hépatique contribuent à la mise en place d'un état d'hypercoagulabilité⁹². Chez les patients infectés recevant un traitement, de nombreuses études utilisent l'inflammation induite par les monocytes et les macrophages plutôt que l'activation des cellules T comme facteur pronostique⁷⁶. L'immunité innée et plus précisément les cellules myéloïdes semblent jouer un rôle majeur dans le maintien de l'inflammation chronique. Des adultes sous traitement cART ont une concentration moyenne en IL-6 (cytokine pro-inflammatoire sécrétée par les monocytes et macrophages) 40% à 60% supérieurs à un groupe témoin du même âge⁷⁹. Dans une autre étude, cette augmentation en IL-6 plasmatique est fortement corrélée avec la mortalité. Le CD14 et le CD163 soluble (sCD14 et sCD163) retrouvés dans le

plasma sont également des marqueurs d'activation des monocytes et des macrophages. Ces deux marqueurs sont élevés chez les patients infectés et sont prédictifs de la morbidité et de la mortalité⁹³. Le sCD14 peut lier le LPS et le délivrer à de nombreux types cellulaires, incluant les cellules endothéliales vasculaires, permettant leur activation par le LPS⁹⁴. De façon intéressante ce marqueur est également élevé dans d'autres maladies caractérisées et exacerbées par une endotoxémie, comme l'hépatite, l'arthrite rhumatoïde et le lupus érythémateux systémique⁷⁶. Le CD163 est le récepteur d'élimination de l'hémoglobine exprimé à la surface des monocytes et des macrophages, particulièrement les cellules au profil inflammatoire (CD14+ CD16+). Le CD163 est libéré sous forme soluble suite à de nombreux signaux inflammatoires, dont la liaison du LPS au TLR4⁹³.

La translocation des produits bactériens a donc un impact majeur sur la persistance de l'inflammation et du réservoir viral malgré la mise en place de traitements⁸⁵. Il n'est pas encore clair si le LPS joue un rôle prédominant dans l'activation du système immunitaire face à la flagelline ou encore le peptidoglycane. Il n'est pas non plus démontré qu'une diminution de la translocation bactérienne entraînera une diminution de l'inflammation chronique, mais cette stratégie thérapeutique est envisagée par certains auteurs³³.

C. Conséquences de l'inflammation chronique sur l'immunité innée

Cette inflammation chronique conduit à la persistance d'altérations de la fonction immunitaire innée et adaptative, favorisant le maintien du réservoir viral. L'inflammation module les différentes populations myéloïdes telles que les polynucléaires neutrophiles, mastocytes, monocytes, macrophages et cellules dendritiques (DC).

1) Dysfonctionnement des neutrophiles au cours de l'infection

Les neutrophiles semblent avoir à la fois un rôle bénéfique et délétère au cours de l'infection par le VIH⁹⁵. Le VIH-1 n'infecte pas les neutrophiles mais entraîne un dysfonctionnement de leur réponse (phagocytose, activation oxydative et destruction des bactéries) et une fréquence d'apoptose supérieure^{96,97}. Les neutrophiles jouent un rôle actif dans le contrôle du virus. La liaison d'un virion à cette cellule entraîne une inflammation mucosale et donc une augmentation de la transmission du virus⁹⁸. L'environnement pro-inflammatoire observé au cours de l'infection par le VIH-1 active les neutrophiles, libérant

des dérivés réactifs de l'oxygène, du TNF- α et de l'IL-8 qui augmentent la réplication virale⁹⁹. Les neutrophiles ont également un rôle dans le contrôle de l'infection en libérant des α -défensines. Ce peptide antimicrobien riche en cystéine peut intervenir dans de nombreuses étapes du cycle viral. Il bloque notamment l'entrée du virus en inhibant l'interaction entre la gp120 du virus et le complexe CD4-corécepteur, et en réprimant l'expression du CD4 et du CXCR4¹⁰⁰. Les α -défensines induisent également une surexpression et une sécrétion de chimiokines, qui à leur tour bloquent les corécepteurs d'entrée du virus¹⁰¹. Les patients infectés par le VIH montrent des niveaux élevés d' α -défensines, dont le niveau n'est pas modifié par la cART et dont l'origine serait associée à l'inflammation chronique¹⁰². Les neutrophiles sont également capables de capturer les particules virales au site infectieux. Une fois activés par le virus via le TLR7 et le TLR8¹⁰³, les neutrophiles meurent en libérant des pièges extracellulaires pour le virus formé de chromatines et d'histones¹⁰⁴. Il semble que le virus puisse échapper à ce mécanisme en stimulant la production d'IL-10 par les DC en se liant au récepteur DC-SIGN, supprimant la formation de ces pièges¹⁰⁴.

L'altération de la fonction des neutrophiles chez les patients infectés par le VIH s'exprime notamment par une susceptibilité aux infections par des bactéries gram positives, gram négatives ainsi qu'aux agents de mycoses⁹⁵. L'infection par le VIH affecte l'expression des molécules d'adhésion, la production de peptides antimicrobiens, le chimiotactisme, la phagocytose, la production de dérivés réactifs de l'oxygène, la polymérisation de l'actine et la production de cytokines⁹⁵. Les mécanismes par lesquels le virus induit ces dysfonctionnements ne sont pas encore totalement compris. Les mécanismes potentiels sont une altération directe de l'environnement cytokinique de la moelle osseuse, une suppression directe de l'hématopoïèse par les protéines virales ou encore un effet myélosuppressif des traitements antirétroviraux. Les patients infectés et non traités possèdent des neutrophiles au profil activé, avec une augmentation de l'expression de CD11b et une diminution de l'expression de la L-sélectine⁹⁸. La perte de la balance T_{REG}/T_H17, déjà développée précédemment, pourrait également expliquer les altérations observées. Très tôt au cours de l'infection les neutrophiles sont sensibles à l'apoptose ce qui expliquerait la neutropénie observée chez certains patients. Il semble que la protéine Nef, ainsi que des récepteurs de mort cellulaire comme Fas soient impliqués dans ce

phénomène¹⁰⁵. De façon intéressante, la diminution précoce des neutrophiles chez le macaque rhésus infecté par le SIV est corrélée avec la vitesse de progression vers le SIDA. Au contraire dans le modèle non pathogène singe vert africain infecté par le SIV, le comptage des neutrophiles n'est pas impacté par la réplication virale¹⁰⁶.

La cART améliore significativement la fonction des neutrophiles, dont la phagocytose, l'activation oxydative, le chimiotactisme et l'activité antifongique contre *Candida albicans*¹⁰⁷. Elle permet également de réduire l'apoptose des neutrophiles en corrélation avec la normalisation de leur numération¹⁰⁸. Néanmoins, des dysfonctionnements persistent chez certains patients malgré une réponse positive au traitement. La persistance de l'inflammation entraîne une stimulation inappropriée des neutrophiles, qui en retour amplifient la réponse inflammatoire. La persistance d'un niveau élevé d' α -défensines joue un rôle immunomodulateur en influant production de cytokines et de chimiokines, l'inflammation, l'activation des cellules immunitaires et le prolongement de la survie des neutrophiles. Une activation excessive et persistante des neutrophiles pourrait avoir un rôle clé dans l'inflammation chronique.

2) Inflammation et activation des monocytes/macrophages

Les monocytes et les macrophages sont capables de porter le VIH, sans que celui-ci ne provoque de cytolysse, faisant de ces cellules un potentiel réservoir^{109 110}. Chez les patients sains, les monocytes classiques exprimant le CD14 (récepteur au LPS) mais pas le CD16, représentent 80-90% des monocytes circulants¹¹¹. L'inflammation durant l'infection par le VIH entraîne une augmentation du nombre de monocytes intermédiaires (CD14+ CD16+) et de monocytes inflammatoires (CD14- CD16+)¹¹². Ainsi le niveau d'expression de CD16 est lié avec la progression de la maladie¹¹³. Les monocytes inflammatoires peuvent représenter entre 10% et 50% des monocytes circulants suivant le stade de la maladie et la mise en place ou non d'une cART^{113 114}. Historiquement, les monocytes n'étaient pas considérés comme des cibles pour le VIH. Mais des études montrent que les monocytes intermédiaires et inflammatoires peuvent être infectés par le virus.

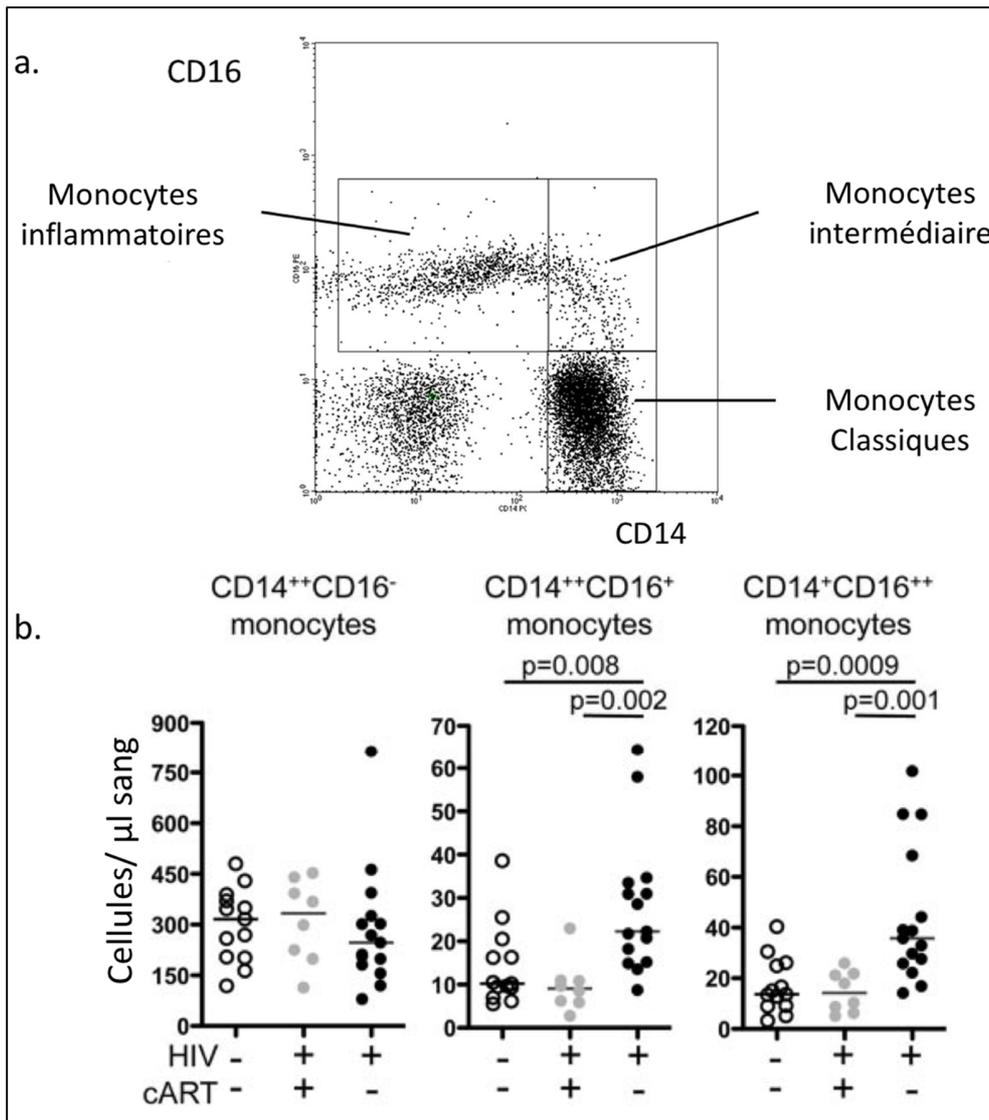


Figure 10 : Impact de l'infection par le VIH sur les sous-populations de monocytes sanguins. (a) Distribution classique des monocytes sanguin chez l'homme suivant le marquage CD14 et CD16¹¹⁵. (b) Monocytes intermédiaires (CD14⁺⁺ CD16⁺) et inflammatoires (CD14⁺ CD16⁺⁺) sont significativement enrichis chez les patients infectés par le VIH et non traités par cART⁹¹. La cART entraine une réduction du nombre de monocytes intermédiaires et inflammatoires chez les patients. Adapté de Dutertre CA et al. *Blood*. 2012 et Ziegler-Heitbrock L. *Front Immunol*. 2015.

Il semble que les monocytes qui expriment le CD16 aient un phénotype proche des macrophages, ce qui explique certainement leur capacité à être infectés¹¹⁶. Les monocytes classiques expriment la protéine antivirale APOBEC3G sous une structure de

bas poids moléculaire, capable de bloquer la transcriptase inverse du VIH. Avec l'activation, les monocytes deviennent inflammatoires et expriment CCR5 et CD4, ainsi que APOBEC3G de haut poids moléculaire, incapable de bloquer la réplication virale. Les monocytes inflammatoires (CD16+) semblent donc susceptibles à l'infection par le VIH¹¹⁶.

Cette activation des monocytes persiste avec la cART et s'explique notamment par la persistance de la translocation bactérienne, la réplication résiduelle, et la co-infection par le cytomegalovirus et d'autres pathogènes (Cf. Chapitre précédent). Chacun de ces mécanismes entraîne une activation des monocytes/macrophages et une altération de leur fonction. Chez les patients infectés, recevant ou on la cART, l'augmentation du LPS entraîne l'activation des monocytes, qui relarguent du sCD14 et sCD163⁸⁹. La translocation bactérienne est donc un activateur clé des monocytes. La translocation microbienne induit également une accumulation des macrophages dans l'épithélium intestinal¹¹⁷. Ces macrophages altérés sécrètent plus de cytokines pro-inflammatoires (IL-1 β) et de chimiokines (CCL5, CXCL9 et CXCL10) et sont incapables de phagocyter des microbes ou des produits microbiens¹¹⁷.

Les patients infectés par le VIH recevant un traitement sont fréquemment infectés par des herpèsvirus comme le cytomegalovirus, le virus de Epstein-Barr (EBV), l'herpèsvirus humain 8 (HHV-8) et le virus de l'herpès simplex de type 1 (HSV-1)¹¹⁸. La co-infection par ces virus participe à l'altération des monocytes et à l'amplification de l'inflammation systémique. Les monocytes peuvent être infectés par l'EBV, ce qui entraîne une réduction de leur fonction phagocytaire, et la stimulation du TLR2 par l'EBV induit une sécrétion de cytokines (MCP-1)^{119 120}. Le HHV-8 peut également infecter les monocytes et les macrophages, établissant une infection productive qui induit également une sécrétion de cytokines inflammatoire et une surexpression du TLR3^{121 122}. Enfin, le HSV-1 peut infecter les monocytes et les macrophages, produisant des cytokines pro-inflammatoires (IL-15) en réponse¹²³. La translocation microbienne et les co-infections par d'autres virus induisent donc des modifications phénotypiques et fonctionnelles des monocytes et des macrophages. Ces altérations conduisent à une suractivation des monocytes/macrophages. Le profil cytokinique inflammatoire résultant amplifie l'inflammation chronique observée chez les patients recevant la cART.

3) Cellules myéloïdes suppressives et altération de la réponse immunitaire

Les cellules myéloïdes suppressives (MDSC) ont été décrites pour la première fois en 1987 comme des cellules suppressives présentes dans la moelle osseuse murine lors de carcinomes pulmonaires¹²⁴. Ces cellules ont été ensuite très étudiées pour leurs implications dans l'immunité anti-cancéreuse. Les MDSC sont une population hétérogène de cellules myéloïdes matures et immatures qui possèdent une activité immuno-régulatrice. Cette population a été identifiée dans des situations de stress immunologique comme la croissance tumorale, les infections et la vaccination avec des superantigènes¹²⁵. Dans ces conditions inflammatoires, leurs précurseurs hématopoïétiques subissent une expansion et une mobilisation depuis la moelle osseuse. Elles furent identifiées chez la souris en utilisant la combinaison des marqueurs Gr-1 et CD11b, et peuvent être sous divisées dans groupes suivant leurs propriétés phénotypiques et biologiques : les MDSC monocytaires (mMDSC) et les MDSC granulocytaires (gMDSC)¹²⁶. Chez l'homme, la caractérisation de ces deux groupes de MDSC reste encore complexe du fait de l'absence d'un marqueur équivalent à Gr-1 et de leur variabilité phénotypique qui est fonction de la maladie, du site anatomique et des conditions physiologiques du patient étudié. Néanmoins un consensus définit les MDSC comme des cellules CD33⁺ CD11b⁺ HLA-DR^{Low/-}. Au sein de cette population, les MDSC CD14⁺CD15^{Low/-} sont proches des mMDSC murines, alors que les MDSC CD14⁻CD15⁺ ressemblent au gMDSC murines¹²⁵.

Lors de l'infection chronique par le VIH-1 une augmentation des MDSC circulantes est observée chez des patients ne recevant pas de cART¹²⁷. Cette augmentation est corrélée positivement avec la virémie et négativement avec le comptage des LT CD4⁺¹²⁷. Cette expansion de cellules suppressives pourrait ainsi participer aux dysfonctionnements de la réponse antivirale innée et adaptative. Ainsi les MDSC sont capables de cibler les LT effecteurs, les cellules « Natural Killer » (NK), les lymphocytes T « Natural Killer » (NKT) ainsi que les cellules présentatrices d'antigènes¹²⁸. L'effet des MDSC sur les LT effecteurs a été largement étudié en oncologie. Les MDSC exercent une action directe en inhibant la prolifération des LT CD8⁺ et CD4⁺, ainsi que la sécrétion de cytokines comme l'IFN- γ par des mécanismes à la fois antigène dépendants et indépendants¹²⁹. De façon similaire les gMDSC, isolées chez des patients dont l'infection au VIH-1 évolue, sont capables

d'inhiber la prolifération *in vitro* de LT CD8+ de patients contrôleurs stimulés par la protéine virale Gag ou Nef. Cette action suppressive semble provenir de l'action d'une enzyme membranaire, la L-Arginase, qui diminue la disponibilité de l'arginine extracellulaire, nécessaire à l'expansion des LT. Certains auteurs rapportent que les MDSC induisent l'expansion des lymphocytes T régulateurs (*Treg*) CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ chez les patients infectés, ce qui pourrait aussi expliquer leur action suppressive. Les MDSC suppriment également la réponse des cellules NK par l'action du TGF- β qu'elles produisent¹²⁸. Enfin, la production de dérivés réactifs de l'oxygène par les MDSC inhibe la différenciation des cellules myéloïdes et notamment des DC. Mais ces deux derniers exemples restent des démonstrations *in vitro* réalisées sur des modèles d'oncologie.

Le nombre de gMDSC diminue significativement après le début de la cART. Les protocoles utilisant les inhibiteurs de désacétylase d'histone, utilisés pour réactiver le réservoir viral, montrent une expansion des MDSC dans un modèle murin. Un rôle des MDSC dans le maintien du réservoir viral est ainsi exposé dans cette étude. Mais encore peu d'études s'intéressent à la cinétique d'apparition des MDSC au cours de la phase aiguë de l'infection, de son traitement, de la mise en place des réservoirs. Pour certains auteurs, il est aussi nécessaire d'étudier les MDSC au niveau des organes lymphoïdes pour comprendre leurs interactions avec les autres cellules immunitaires et leur microenvironnement. La complexité de l'étude de cette sous-population suppressive repose surtout sur le manque de marqueurs spécifiques, rendant parfois difficile la comparaison des études. Ces mécanismes, protecteurs contre les immunopathologies induites par l'inflammation, empêchent néanmoins la mise en place d'une réponse innée et adaptative antivirale efficace, aboutissant à la persistance du virus. Cette réponse suppressive erronée, pour certains auteurs, participe à l'activation chronique du système immunitaire et donc à l'inflammation observée chez les patients.

4) Mastocytes et immunité mucoale : un nouvel acteur de la physiopathologie du VIH ?

Les mastocytes sont des cellules myéloïdes provenant d'un précurseur hématopoïétique et qui effectuent leur maturation finale au niveau tissulaire. Ils se positionnent dans des sites stratégiques, en contact avec les interfaces environnement-hôte, tels que la peau, les voies aériennes, le tractus gastro-intestinal et le tractus urinaire¹³⁰. Les mastocytes expriment de nombreux récepteurs de reconnaissance des pathogènes (PRR), jouant un rôle important dans l'immunosurveillance des pathogènes¹³¹. Les mastocytes interagissent avec les cellules immunitaires via des facteurs solubles et contacts directs¹³². Ces cellules jouent ainsi un rôle modulateur et aident le passage de l'immunité innée à l'immunité adaptative dans la réponse contre les pathogènes. Il a été montré que les mastocytes jouent un rôle important dans la défense antivirale contre le virus de la stomatite vésiculeuse, le virus de Sendai, hantavirus, dengue, reovirus, virus influenza, virus herpès simplex et le cytomégalovirus murin¹³⁰. Les mastocytes peuvent également jouer le rôle de cellule présentatrice d'antigène en formant une synapse immunologique avec les LT¹³³.

Peu d'études sont disponibles sur le rôle des mastocytes dans l'infection par le VIH-1. Une étude montre une densité en mastocyte augmentée dans la muqueuse vaginale de femmes infectées par le VIH¹³⁴. Une autre étude démontre une augmentation du nombre de mastocytes chez des hommes souffrant de diarrhées associées au SIDA¹³⁵. Les mastocytes muqueux expriment une grande variété de facteurs d'attachement du VIH-1 comme DC-SIGN et HSPG. Il a été démontré que les mastocytes peuvent capturer le VIH-1 et le transmettre au LT CD4+ via une synapse immunologique¹³⁶. Les mastocytes pourraient donc participer à la dissémination du virus dans les tissus muqueux, au maintien des réservoirs viraux et à la persistance de l'inflammation. Néanmoins, aucune étude actuellement référencée ne se penche sur l'impact du traitement cART sur cette population myéloïde.

5) Cellules dendritiques et efficacité de la réponse antivirale

Une des caractéristiques de l'infection chronique non traitée par le VIH est certainement la suppression de la réponse immune. La perte des LT CD4⁺ y contribue, mais le dysfonctionnement des cellules dendritiques (DC) semble également y jouer un rôle fondamental. Les DC sont des cellules présentatrices d'antigène qui ont un rôle crucial dans l'activation et le conditionnement des cellules T spécifiques du virus. Les DC sont généralement divisées en deux populations : les DC myéloïdes (mDC) et les DC plasmacytoïdes (pDC). Toutes les deux sont spécialisées dans la détection de virus et l'initiation de la réponse innée et adaptative amenant à l'élimination ou au contrôle du virus. Elles expriment des récepteurs de reconnaissance des pathogènes (PRR) comme les TLR et les lectines de type-C. Après détection et capture du virus dans les tissus périphériques, elles migrent vers les nœuds lymphatiques où elles initient la réponse immunitaire adaptative et favorisent l'activation des cellules NK¹³⁷. Les mDC activées produisent des cytokines comme l'interleukine-12 (IL-12), l'IL-15 et l'IL-18. L'IL-12 est nécessaire pour induire des LT_H1, qui permettent de potentialiser le pouvoir cytotoxique des cellules T cytotoxiques (LT_C), cellules nécessaires à l'élimination des cellules infectées¹³⁸. L'IL-12 et l'IL-15 produites par les mDC peuvent également activer les cellules NK¹³⁹. Les pDC produisent plus d'interféron de type I (IFN) en réponse au VIH que n'importe quelle autre cellule du corps, et stimulent indirectement les mDC et les cellules NK¹⁴⁰.

Les DC expriment les récepteurs d'entrée du virus CD4, CCR5 et CXCR4 qui permettraient l'internalisation du virus, mais l'infection productive des DC par le VIH est controversée. De plus, les mDC expriment des lectines de type-C comme DC-SIGN, la langerine (CD207) et DCIR¹⁴¹. La liaison de la gp120 du virus avec DC-SIGN entraîne une internalisation du virus dans un compartiment endosomal précoce où le virus n'est pas dégradé. Ce mécanisme permet à la mDC de transporter le virus intact aux nœuds lymphatiques, où elle formera une synapse immunologique avec une cellule T CD4⁺ durant le mécanisme de présentation de l'antigène. Le virus est alors libéré au plus près de sa cible par un mécanisme appelé synapse virologique¹⁴². Bien que les pDC expriment des lectines de type C comme BDCA2, la liaison et l'internalisation du VIH s'effectue préférentiellement via leurs CD4¹⁴³. Une fois dans la cellule, les pDC reconnaissent l'ARN

simple brin du virus via le TLR7 et le TLR9, induisant la production d'IFN type I et d'autres cytokines pro-inflammatoires¹⁴⁴, qui amplifient l'inflammation chronique.

L'infection par le VIH induit une diminution progressive nombre de DC circulantes (pDC et mDC), qui est corrélée avec l'augmentation de la charge virale plasmatique et la progression de la maladie¹⁴⁵. Les patients infectés chroniquement par le VIH ont moins de DC circulantes par comparaison aux témoins non infectés¹⁴⁶. Cette diminution de la fréquence des DC se produit durant la phase aiguë de l'infection et se maintient dans la phase terminale de l'infection¹⁴⁶. Une des hypothèses est que la diminution de la fréquence des DC circulantes est due à redistribution de celle-ci vers les organes lymphoïdes secondaires, ainsi qu'une apoptose accrue induite par l'inflammation. Les pDC s'accumulent dans les nœuds lymphatiques où elles produisent de fortes quantités d'IFN- α .¹⁴⁷ Il est rapporté par Finke *et al.* que la mise en place de la cART restaure la distribution et la quantité de DC circulantes⁹¹. Mais une étude plus récente montre que la primo-infection par le VIH n'a pas d'effet sur le nombre de mDC, cependant le nombre de pDC et de cellules T CD4+ était réduit. Il est restauré par la mise en place du traitement¹⁴⁸. Néanmoins la cART ne restaure pas leurs capacités à activer les cellules T, NK¹⁴⁹ et à induire une réaction mixte lymphocytaire. Après mise en place de la cART, les pDC n'augmentent pas dans la circulation et conservent un phénotype activé, produisant de fortes quantités d'IFN de type I et de cytokines inflammatoires.

Il semble que les mDC de patients infectés chroniquement sont moins efficaces pour stimuler l'activation des cellules T par comparaison aux individus sains¹⁵⁰. Comme pour les monocytes, les DC sont stimulées de façon directe et indirecte par le LPS et les produits microbiens⁸⁵. En réponse, les monocytes produisent de l'IL-10 conduisant à une maturation partielle des mDC, les rendant tolérantes et incapables de répondre à d'autres stimuli (**Figure 11**). Cependant certaines études montrent que les mDC, isolées chez des patients en phase aiguë de l'infection, répondent de façon exagérée à la stimulation des TLR. Elles produiraient plus d'IL-12, IL-6, de TNF et de MIP1 α comparé à des mDC de patient non infectés¹⁴⁶. Ces résultats divergeant montrent la difficulté de l'analyse fonctionnelle *ex vivo* des mDC et la difficulté de comparaison de cohortes à des stades différents de l'infection. La fonction des pDC est également altérée. Lorsqu'elles

s'accumulent dans les nœuds lymphatiques elles sécrètent de l'indoléamine 2,3-dioxygénase (IDO), une enzyme qui perturbe la mise en place d'une immunité adaptative efficace^{151 147}. L'IDO, en métabolisant le tryptophane en kynurenine, serait responsable de la polarisation des LT CD4+ en cellules T_{REG}, qui suppriment l'activation des cellules T effecteurs¹⁵². Les pDC pourraient donc participer à la disparition des cellules T_{H17} en déplaçant la balance vers la polarisation T_{REG}, favorisant la translocation microbienne (Figure 11).

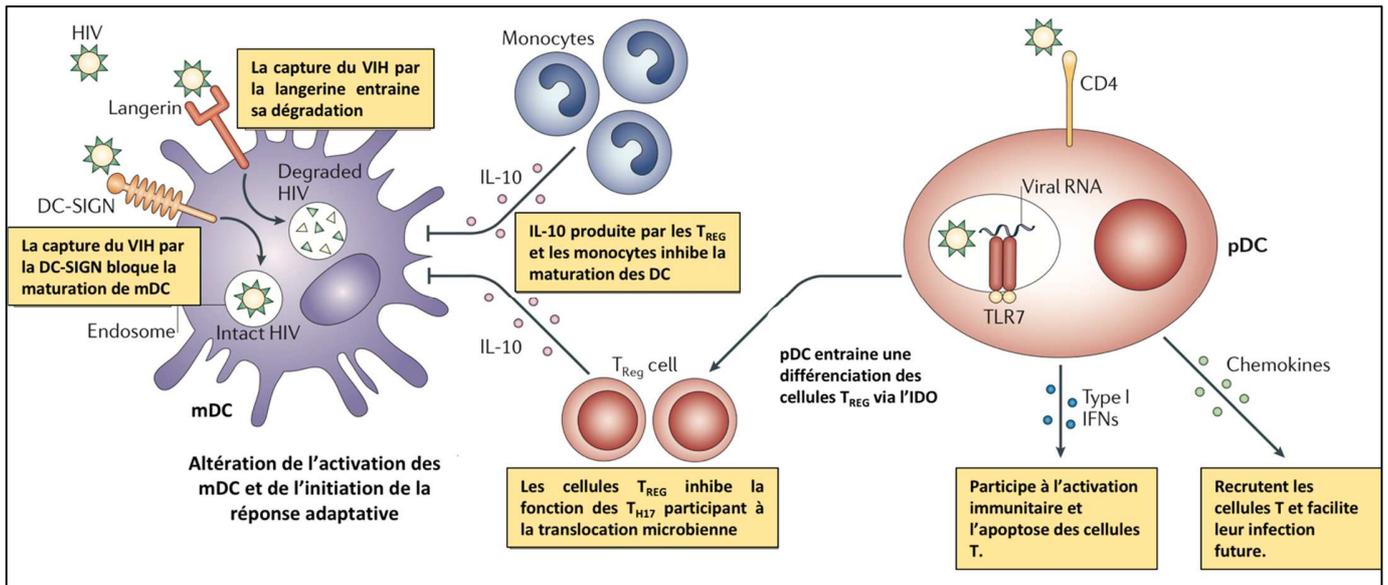


Figure 11 : mDC et pDC durant l'infection par le VIH ¹³⁷. Il semble que les mDC ont une fonction altérée durant l'infection par le VIH, empêchant l'initiation d'une réponse antivirale efficace. Ceci est notamment due à l'interaction directe du VIH avec les mDC (DC-SIGN) et des mécanismes indirects, comme la production d'IL-10 par les monocytes durant l'infection. Les pDC sont des médiateurs de l'immunité innée produisant de l'IFN de type I, qui en plus de bloquer la réplication virale entraîne une mort cellulaire des cellules T CD4+. Les chimiokines qu'elles produisent attirent les cellules T CD4+ au site de réplication virale, où elles seront infectées. Enfin, les pDC induisent des cellules T_{REG}, qui altèrent à leur tour la fonction des mDC. *Adapté de Altfeld M et al. Nat Rev Immunol. 2011.*

4. Impact du traitement précoce sur le contrôle de l'infection

La cohorte de patients « VISCONTI » (Viro-Immunological Sustained CONTROL after Treatment Interruption) ouvre une nouvelle perspective dans la gestion du traitement de l'infection par le VIH. Vingt patients, appelés « Post-Treatment Controllers » (PTC), ont contrôlé leur virémie pendant plus de 10 ans après l'interruption du traitement antirétroviral, qui a duré en moyenne 10 ans. La caractéristique commune des PTC est l'initiation du traitement très tôt au cours de l'infection et son maintien pendant plusieurs années avant interruption¹⁵³. A l'arrêt du traitement, le réservoir viral chez ces patients était significativement inférieur à celui des individus chez qui l'interruption du traitement s'est accompagnée d'un rebond de la charge virale plasmatique (**Figure 2**). Entre 5 et 15% des patients ayant bénéficié d'un traitement précoce seraient ainsi capables de contrôler leur virémie à long terme, à l'issue d'une interruption thérapeutique programmée¹⁵³. Il est possible alors d'envisager un changement des schémas thérapeutiques actuels. Si l'éradication du virus reste encore un objectif difficile à envisager, la rémission durable observée chez les patients PTC, serait une alternative réaliste. Elle permettrait des traitements discontinus, limitant les effets indésirables à long terme et les problèmes d'observance.

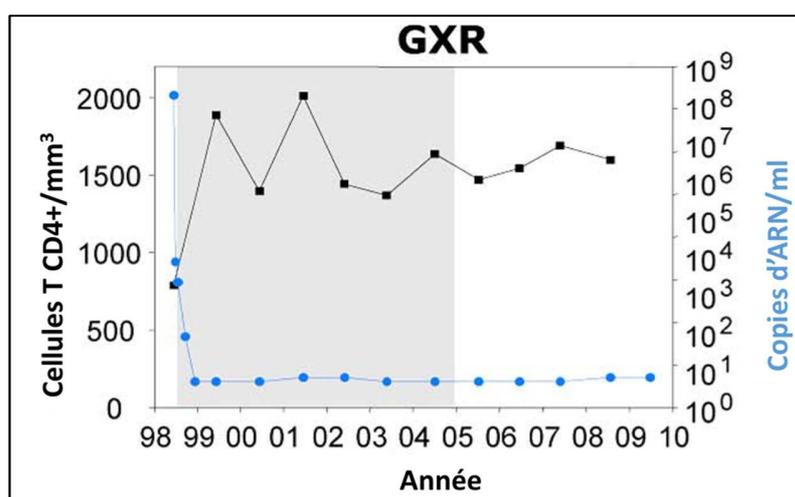


Figure 12 : Suivi de la charge virale plasmatique et du comptage des lymphocytes T CD4 chez les PTC après diagnostic de la primo-infection chez un patient de la cohorte VISCONTI¹⁵³. La zone grise correspond à la durée du traitement *Adapté de Saez-Cirion A, Bacchus C, Hocqueloux L, et al. PLoS Pathog. 2013.*

Afin de décrire les caractéristiques immunologiques de ce contrôle de la réplication virale, *Saez-Cirion A et al.* ont comparé cette cohorte de patients à des patients virémiques, des patients sous cART et des « contrôleurs du VIH » (HIV controllers, HIC). Les HIC représentent un très faible pourcentage de personnes infectées par le VIH (<1%) capables de contrôler la réplication virale en absence de traitement¹⁵⁴. Plusieurs définitions existent pour caractériser ces contrôleurs naturels du virus, mais la définition française fait référence aux patients capables de maintenir une virémie inférieure à 400 copies/ml pendant plus de 5 ans après infection. Ces patients montrent une réponse T CD8+ antivirale très efficace. Ce mécanisme de contrôle provient en partie d'une association d'allèles du système HLA (Human Leucocyte Antigènes) de classe I particulière, avec une surreprésentation du HLA-B*27 et du HLA-B27 chez les HIC¹⁵⁵ (**Figure 13.A**). Les propriétés uniques de la cavité de liaison peptidique du HLA-B*57 et la nature des interactions CMH-peptide sont associées au contrôle de l'infection. La sélection thymique via le HLA-B*57 amène à un répertoire de cellules T spécifique du virus¹⁵⁶. De plus, les épitopes inféodés aux HLA-B*57/B27 concernent des régions hautement conservées des protéines virales, rendant l'échappement du virus à la réponse cellulaire plus difficile pour le virus. Enfin, ces HLA interagissent spécifiquement avec des récepteurs immunoglobuline-like des cellules NK (KIR), permettant une élimination des cellules infectées par les cellules NK¹⁵⁷.

Saez-Cirion A et al. a démontré que les mécanismes de contrôle mis en jeu chez les PTC semblent différent (**Figure 13**). D'abord les HLA de classe I associés au contrôle de l'infection chez les HIC (B*57 et B27) sont exprimés à une fréquence comparable à la population française. Les PTC ont également une réponse antivirale des cellules T CD8+ spécifiques plus faible que les HIC. Les PTC montrent un niveau d'activation des cellules T faible. Les niveaux d'expression de HLA-DR et de CD38 sont inférieurs sur les cellules T CD8+. Enfin le réservoir viral des PTC est plus petit et diminue même chez certains patients au cours du temps. Le réservoir inductible du VIH se situe surtout dans les populations de cellules T CD4+ mémoires au repos.

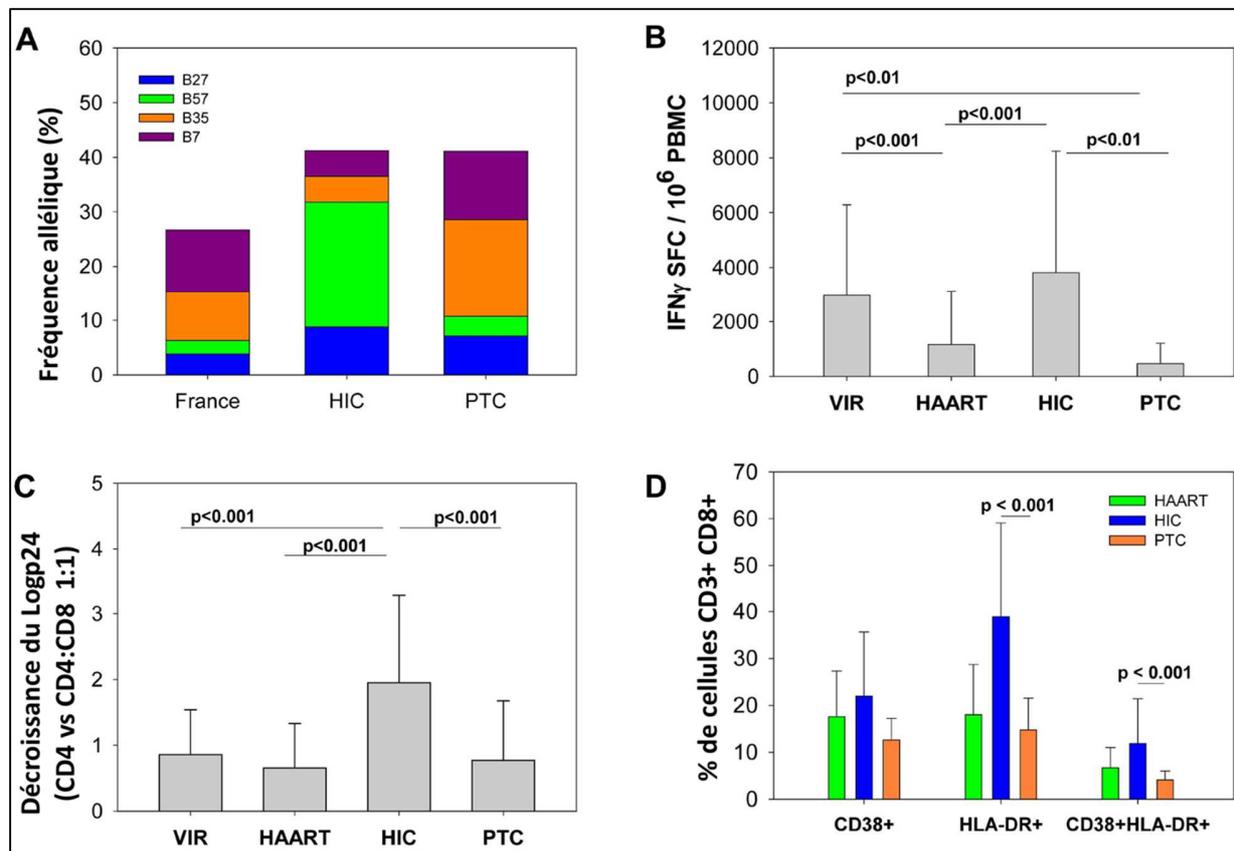


Figure 13 : Les contrôleurs après traitement (PTC) diffèrent des contrôleurs naturels du VIH (HIC) par le profil du HLA de classe I, la fréquence et la qualité de la réponse antivirale T CD8 spécifique et du niveau d'activation des cellules T CD8+¹⁵³. (A) Fréquence des allèles de protection HLA-B*27 et B*57, et des allèles de risque HLA-B*07 et B*35 dans la population française (N=6094) ainsi que les cohortes de HIC (n=148) et PTC (n=28). (B) fréquence des cellules T CD8+ spécifiques estimées comme le nombre de cellules T CD8+ produisant de l'IFN-γ après une stimulation par le VIH-1 (SFC : cellules formant un spot) chez les patients virémiques non traités (n=57), sous cART (n=60), HIC (n=100) et PTC (n=12) (C) Capacité des cellules T CD8+ des patients virémiques, cART, HIC et PTC de supprimer l'infection de cellules T CD4+ autologues, déterminé comme la diminution du log de p24 sécrété. (D) Pourcentage de cellules T CD8+ de patients sous cART, HIC et PTC exprimant *ex vivo* CD38, HLA-DR ou les deux. Adapté de Saez-Cirion A, Bacchus C, Hocqueloux L, et al. PLoS Pathog. 2013.

Le mécanisme favorisant le contrôle chez les PTC est probablement double : l'initiation d'un traitement précoce permettrait, à la fois, de limiter la taille du réservoir initial et de préserver les capacités de défense de l'organisme¹⁵⁸. L'hypothèse sous-jacente est que les traitements précoces permettent de préserver les populations myéloïdes et d'induire une plus faible inflammation. Cet environnement favoriserait l'efficacité des cellules NK à éliminer les cellules infectées, et les fonctions des DC pour initier une réponse adaptative antivirale efficace. Cela limiterait également l'effet des cellules régulatrices, qu'il s'agisse de Treg ou de MDSC. L'identification des marqueurs de ces cellules et de leurs fonctions, combinée à l'étude des paramètres virologiques, permettrait de mieux prédire la capacité de l'hôte à contrôler la réplication au moment de l'interruption du traitement. Ces marqueurs seraient essentiels à une approche plus personnalisée du traitement anti-VIH, pour obtenir une rémission durable.

II. Objectif de travail

L'objectif principal du projet est de comprendre les mécanismes par lesquels un traitement précoce impacte sur les populations myéloïdes à l'aide du modèle de l'infection expérimentale du macaque cynomolgus (*Macaca fascicularis*) par le SIV. Ce projet est parti intégrante d'un programme plus large du consortium RHIVIERA, p-VISCONTI, sur les mécanismes permettant un meilleur contrôle du réservoir viral et de la réplication résiduelle et l'identification des marqueurs prédictifs de la rémission post traitement. Le projet p-VISCONTI mené chez le macaque Cynomolgus permet de mieux contrôler les paramètres étudiés tels que la date de l'infection, la date de l'initiation des traitements et leur composition, et autorise la réalisation de prélèvements sanguins et tissulaires multiples, impossibles à réaliser chez l'homme, tels que les prélèvements de nœuds lymphatiques, de tissus adipeux profond ou de biopsies rectales, de moelle osseuse et des lavages broncho-alvéolaires.

L'infection des macaques par les souches pathogènes SIV, comme le SIVmac251, représente actuellement l'un des modèles parmi les plus pertinents pour l'étude de la prévention et du traitement de l'infection par le VIH. Le répertoire des cellules cibles du

SIV est très proche de celui du VIH¹⁵⁹. La transmission expérimentale du SIVmac251 se traduit chez le macaque par une infection chronique et le développement d'une immunodéficience comparable au SIDA chez l'homme¹⁵⁹. L'inflammation persistante caractérise l'infection pathogène du macaque par le SIV, par comparaison aux infections non pathogènes des singes africains par leur virus. De plus, le traitement de l'infection du macaque par le SIV, à l'aide des combinaisons antirétrovirales actuelles, comme l'association du tenofovir (TDF), de l'emtricitabine (FTC) et du dolutégravir (DLG), diminue la charge virale plasmatique avec une cinétique et une efficacité identiques à celles des patients qui bénéficient des mêmes traitements²⁴.

Pour évaluer le moment optimal pour initier la cART, son impact sur la virémie, le réservoir viral et les populations myéloïdes, plusieurs groupes d'animaux, (comprenant chacun 6 à 18 individus) seront infectés et/ou traités à différents temps de l'infection (4 heures, 7 jours, 21 jours, 30 semaines). Le traitement réalisé 4 heures post-infection correspond aux traitements post-exposition où le réservoir viral s'établit faiblement¹⁶⁰. A 7 jours post-inoculation, le traitement a lieu durant la phase aiguë de l'infection où le réservoir viral se met en place en parallèle de la réponse immune. A 21 jours, la réponse immune antivirale capable de diminuer la charge virale plasmatique se met en place. A 30 semaines post-inoculation l'infection chronique sera établie et la mise en place du traitement aura lieu tardivement, comme cela est fréquemment le cas lors du diagnostic de l'infection chez l'homme. Ces traitements seront maintenus pendant au moins 18 mois et une partie des animaux sera euthanasiée pour échantillonner différents tissus et cellules résidentes. Dans le cadre de mon projet de thèse vétérinaire, l'impact de l'infection chronique par le SIV sur les populations myéloïdes chez le macaque *Cynomolgus* a été évalué dans deux compartiments : la moelle osseuse et le sang périphérique. Cette étude était préliminaire à la mise en place du programme p-Visconti. Le sang périphérique est un compartiment clé, carrefour de la migration des cellules immunitaires depuis les organes lymphoïdes primaires (lieux de production hématopoïétique) vers les organes lymphoïdes secondaires (sites sentinelles des tissus) et les tissus périphériques comme les muqueuses. La facilité d'accès aux prélèvements sanguins et la valeur informative de celui-ci en fait un compartiment de choix pour étudier la dynamique des populations myéloïdes. La moelle osseuse est affecté par l'infection VIH, ce qui se traduit fréquemment chez les patients non traités par une anémie, une thrombocytopénie et une

neutropénie¹⁶¹. L'origine de ces désordres hématologiques est triple. 1) Le VIH a un effet perturbateur direct sur les cellules souches hématopoïétiques (HSC) mais il est incapable de s'y multiplier¹⁶¹. 2) L'orage cytokinique associé à l'infection perturbe le microenvironnement des HSC et donc de façon indirecte l'hématopoïèse^{161 162}. 3) Enfin, l'infection perturbe les populations des neutrophiles, monocytes et macrophages, qui produisent moins de facteur de stimulation des colonies de granulocytes (G-CSF) nécessaire à la granulopoïèse¹⁶¹. Ces altérations de la moelle osseuse hématopoïétique peuvent persister sous cART. Ainsi 35% des patients sous cART seront anémiés à un moment de leur vie¹⁶¹. Néanmoins, peu d'informations sur la dynamique des populations myéloïdes et de leurs cellules progénitrices CD34+ sont disponibles à l'heure actuelle. Le suivi de ce compartiment au cours de la phase aiguë et chronique de l'infection, ainsi que durant son traitement permettra d'identifier des marqueurs associés à la progression de la maladie et son contrôle. Afin de caractériser finement les populations myéloïdes de notre modèle, une approche de caractérisation et de quantification de nombreux marqueurs est nécessaire. La cytométrie de masse est une technologie donnant accès simultanément à plus de 34 paramètres par cellule, et permettant la découverte de populations cellulaires et de disséquer la complexité phénotypique des cellules immunes¹⁶³. Un des atouts de cette technologie est de pouvoir détecter des populations cellulaires rares. La démarche d'analyse non supervisée développée avec cette technologie permet une analyse à la fois à l'échelle d'un groupe de cellules similaires (cluster)¹⁶⁴ mais également à l'échelle d'une cellule.

III. Matériels et méthodes

1. Sujets et prélèvements de sang total et de moelle osseuse

Cinq macaques adultes *Cynomolgus* (*Macaca fascicularis*) : 3 sains et 2 infectés chroniquement par le virus SIVmac251 ont été hébergés individuellement dans des cages au sein de l'animalerie de biosécurité de niveau 3 du Commissariat à l'Energie Atomique et aux Energies Alternatives (CEA Fontenay-aux-Roses). Le groupe témoin est constitué de trois macaques, deux femelles et un mâle, d'un âge moyen de trois ans et naïfs du SIV. Le groupe infecté par le SIV est constitué de deux macaques, un mâle et une femelle, d'un âge moyen de 4 ans. L'expérimentation a été approuvée par le Comité d'Ethique en Expérimentation Animale de la Direction des Sciences du Vivant au CEA. L'hébergement et les procédures expérimentales ont été effectués suivant les directives de l'Europe pour le soin aux animaux. 2 animaux ont été infectés par voie intraveineuse (1000 AID50) par la souche SIVmac251 et suivis pendant plus de 18 mois post-infection. Les prélèvements de sang ont été réalisés avec des tubes héparinate de Lithium (Vacutainer BD, USA) et les prélèvements de moelle osseuse avec des tubes de citrate de sodium, à l'aide d'une anesthésie utilisant de la kétamine (10mg/kg, Rhone-Mérieux, Lyon, France). Détenteur de la formation Utilisation et Protection de l'Animal de Laboratoire, niveau concepteur de projet (FELASA C level), mon activité a été encadrée par l'équipe de Science et Bien-être de l'Animal, de l'UMR, dirigée par le Dr Christophe Joubert.

2. Réactifs et solutions

Le mélange de fixation (FM) utilisé pour le stockage des cellules a été préparé extemporanément ¹⁶⁵. Brièvement, deux fractions de tampon phosphate Dulbecco doublement concentré (DPBS), préparé depuis une solution de DPBS 10X sans CaCl₂ et sans MgCl₂, pH 7,4 (Gibco by Life Technologies, Villebon-Sur-Yvette, France), une part de formaldéhyde 20% préparée depuis une solution de paraformaldéhyde à 36% (VWR BDH Prolabo, Fontenay-sous-Bois, France) et une part de glycérol à 75% (Sigma Aldrich, Lyon, France) sont mélangés ensemble. La solution résultante était stockée à +4°C et utilisée dans les deux jours. La solution de fixation (PBS/PFA 1,6%) utilisée durant le marquage, était préparée en diluant du paraformaldéhyde 16% (PFA; Electron Microscopy Sciences, Hatfield, USA) dans du DPBS 10X modifié et de l'eau Mili-Q. Le

tampon de marquage (PBS/BSA 0,5%) était préparé en mélangeant du DPBS 1X modifié (Gibco by Life Technologies) avec de la BSA 0,5% (Sigma Aldrich, Lyon, France).

3. Préparation du panel d'anticorps couplés aux métaux lourds (Lanthanides)

Les anticorps monoclonaux ont été commandés auprès de plusieurs fournisseurs dans une formulation pure en solution saline sans stabilisateur protéique. Les anticorps ont été couplés aux lanthanides en utilisant les kits de couplage commerciaux MAXPAR (fluidigm, San Francisco, USA). Le couplage se fait en deux étapes : dans un premier temps le lanthanide pur est conjugué à un polymère chélateur et dans un deuxième temps le complexe lanthanide/polymère est couplé à l'anticorps. Pour cela, les anticorps purifiés sont partiellement réduits à l'aide d'une solution de TCEP (tris(2-carboxyethyl)phosphine hydrochloride) (Pierce Thermo, Rockford, IL) permettant de dissocier les ponts di-sulfures et ainsi le complexe isotope/polymère peut se fixer à l'anticorps . Le produit final est ensuite purifié et ajusté à une concentration de 1mg/ml dans une solution stabilisatrice de protéines (CANDOR bioscience). Pour mettre au point ce panel de 33 marqueurs, plus de 70 clones d'anticorps ont été testé afin de sélectionner ceux qui produisent une réaction croisée chez le macaque.

4. Préparation des cellules et stockage

Les échantillons de sang et de moelle osseuse ont été traités suivant une procédure de fixation, lyse des globules rouges et congélation permettant la conservation de tous les leucocytes, notamment les polynucléaires. Un millilitre de sang ou de moelle osseuse a été mélangé avec 10 ml de FM, et incubé 10 minutes sur glace. Après centrifugation, les globules rouges ont été lysés par addition de 10 ml d'eau Mili-Q à température ambiante (RT) pendant 20 minutes. Après deux lavages en DPBS 1X, les cellules ont été comptées et ajustées à une concentration finale de 15×10^6 leucocytes fixés/ml en FM. Les cellules ont ensuite été stockées en aliquots de 3×10^6 cellules à -80°C .

5. La technologie de cytométrie de masse

A. De la cytométrie en flux à la cytométrie de masse

La cytométrie en flux a permis de mieux comprendre et de caractériser les cellules hématopoïétiques. Elle repose sur l'utilisation d'anticorps marqués par des molécules fluorescentes. Par cette approche, le système détecte des cellules ou des particules se déplaçant au sein d'un fluide vers un laser, qui excitera les molécules fluorescentes dont la radiation émise sera détectée et quantifiée. Cette technologie fut utilisée pour caractériser les populations B et T, définissant l'immunité humorale et cellulaire¹⁶⁶. Plus tard, le développement des anticorps monoclonaux dans les années 1970¹⁶⁷, ainsi que l'émergence de l'épidémie du VIH dans les années 1980 a vu naître la quantification en trois couleurs des sous-populations T (CD4+ et CD8+). Les avancées dans la technologie de cytométrie en flux ont donné accès à une caractérisation précise du système immunitaire dans de nombreuses pathologies. Actuellement il est possible de mesurer de multiples signatures biologiques par cytométrie en flux : protéines, glycosylations, phosphorylations, acides nucléiques et concentrations ioniques. Les cytomètres les plus perfectionnées détectent jusqu'à 20 paramètres par cellules grâce notamment à de nouveaux fluorochromes¹⁶⁸. A l'aide de systèmes de détection de la diffraction lumineuse il est possible de déterminer la taille et la granulosité de chaque cellule. La limitation majeure de la cytométrie en flux est liée au principe de détection du signal. Ainsi les fluorescences émises par les fluorochromes, après excitation par laser, se superposent les unes aux autres entraînant un phénomène connu sous le nom de superposition spectrale¹⁶³. Il est alors difficile de différencier le signal généré par des marqueurs distincts. La gamme de longueur d'onde théorique d'émission d'un fluorochrome détecté par l'appareil, appelé canal, peut donc recevoir des signaux parasites issus d'autres fluorochromes. Des logiciels permettent cependant de séparer les spectres d'émission des différents fluorochromes afin d'isoler le signal de chaque canal. Cependant le seuil de positivité et de négativité du signal reste souvent un paramètre défini par l'opérateur, ce qui peut générer un biais d'interprétation.

Une nouvelle plateforme a été développée pour répondre à ce besoin, couplant cytométrie en flux et spectrométrie de masse. La spectrométrie de masse permet ainsi l'analyse d'au moins 45 paramètres simultanément sur une même cellule en utilisant des anticorps couplés à des métaux lourds¹⁶³. Ces métaux sont des terres rares utilisées sous forme d'isotopes stables (non radioactifs), absents de la composition chimique du vivant. Il n'y a donc plus de superposition spectrale dans cette approche. De plus l'exploitation de la résolution, de la sensibilité et de la gamme dynamique de la spectrométrie de masse permet des analyses cytométriques de haute capacité¹⁶⁹.

B. Fonctionnement de la cytométrie de masse

La cytométrie de masse est l'adaptation de l'analyse en spectrométrie de masse de plasma à couplage inductif (ICP-MS) vers l'analyse d'une cellule, selon le concept qu'un seul isotope purifié peut être utilisé pour marquer un anticorps¹⁶⁴. Les cellules sont donc préalablement marquées par des anticorps spécifiques couplés avec des isotopes métalliques de Lanthanides (**Figure 14**). Les cellules sont également marquées avec du Rhodium et de l'Iridium conjugués avec un agent intercalant de l'ADN, donnant une mesure de la viabilité cellulaire.

Le système fluide nébulise les cellules marquées à l'aide d'un flux d'Argon, afin d'obtenir une cellule par goutte de fluide. Les gouttelettes sont ensuite introduites dans un plasma d'Argon à 7 000K (température à la surface du soleil) où elles seront atomisées puis ionisées. Le nuage d'ion provenant d'une cellule est filtré à l'aide d'un quadripôle permettant de conserver les ions provenant des métaux lourds présentant une masse molaire élevée et d'éliminer les ions provenant de la cellule de faible masse molaire. Chaque ion va ensuite atteindre le détecteur à une vitesse qui dépend de sa masse molaire : il s'agit du temps de vol (TOF). La durée de vie du nuage d'ions étant de 200µs, des analyses spectrales sont effectuées toute les 13µs par l'analyseur TOF¹⁶⁹. Les spectres générés sont intégrés et transformés numériquement.

Des fichiers « . fcs » équivalents à ceux de la cytométrie en flux classique sont générés à la fin de l'acquisition.

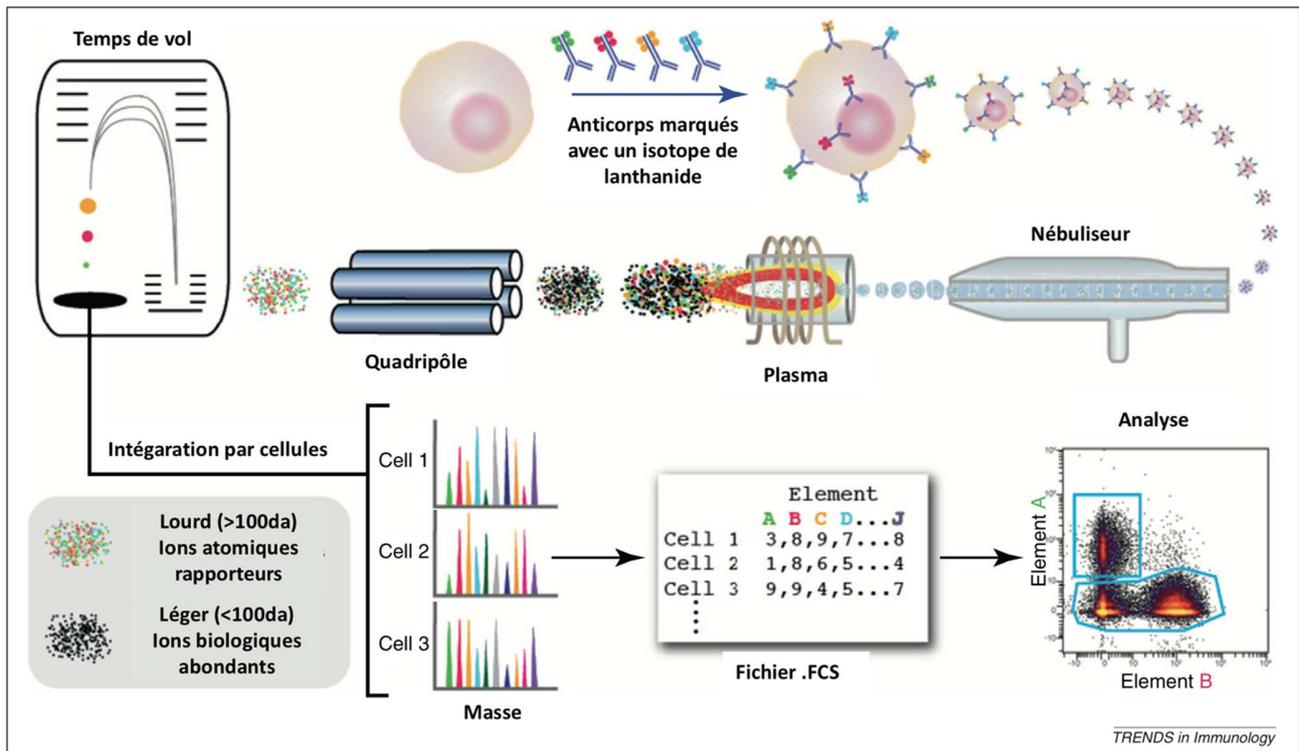


Figure 14 : Fonctionnement de l'analyse par cytométrie de masse de marqueurs cellulaires¹⁶³. Un anticorps est marqué spécifiquement avec un élément lourd lie son épitope cellulaire. La cellule est introduite dans le plasma à couplage inductif (ICP) sous forme de gouttes nébulisées. Chacune des cellules est atomisée puis ionisée et les ions lourds sont filtrés par le quadripôle. Le détecteur de temps de vol détermine la composition en métaux lourds rapporteurs. Chacun des éléments rapporteurs est corrélé avec la présence du marqueur, puis analysé par les plateformes classiques de cytométrie. Adapté de Bendall SC, Nolan GP, Roederer M, Chattopadhyay PK. *Trends Immunol.* 2012.

C. Avantages et inconvénients de la cytométrie de masse

La cytométrie de masse ne donne pas accès à la taille et à la granulosité cellulaire de fait de l'approche physique utilisée. La sensibilité des couplages anticorps-métaux est plus faible par rapport aux rapporteurs fluorescents car les polymères de chélation autorisent un maximum de 100 ions métalliques par anticorps ce qui crée un signal plafond¹⁷⁰. La vitesse d'échantillonnage est également limitée à 1000 cellules/s contre 25 000 à 50 000 cellules/s en cytométrie en flux¹⁷¹. De plus, le système de nébulisation est inefficace et

ainsi seulement 30% des cellules initialement introduites finiront par être analysées. Enfin, cette technologie est destructrice des cellules introduites du fait de l'utilisation d'un plasma. Le tri cellulaire n'est donc pas possible.

L'absence de superposition spectrale est un avantage majeur de cette technologie. Le seul signal d'interférence provient d'impuretés isotopiques pouvant modifier la masse de plus ou moins un Dalton, ou de l'oxydation des métaux qui augmente la masse de 16 Daltons¹⁷¹. Le faible bruit de fond du cytomètre de masse permet de réaliser des mesures multiplexées. Enfin, cette méthode permet de mesurer de nombreux paramètres et donc d'identifier des populations cellulaires rares. Cytométrie en flux et cytométrie de masse sont deux approches complémentaires. La cytométrie de masse permet la découverte de populations cellulaires rares et l'identification de marqueurs qui pourront ensuite être utilisées en cytométrie en flux et pour le tri cellulaire. Cytométrie de masse, via le nombre de marqueurs étudiés donne également une vision plus globale et complexe du système immunitaire.

6. Marquage et acquisition au cytomètre de masse

Les échantillons sont décongelés à 37°C et lavés deux fois avec du PBS/BSA 0,5%. Ils sont ensuite mis en présence d'anticorps couplés à des métaux lourds (**Annexe 1**) et dilués dans du PBS/BSA 0.5%. Les anticorps sont dirigés contre les marqueurs de surface suivants : .CD66, HLA-DR, CD3, CD64, CD8, CD45, CD123, CD11a, CD11b, CD38, CD16, CD23, CD86, CD32, CD162, CCR7, CD5, CD1c, CX3CR1, CD34, CXCR4, CD39, CCR5, CD28, CD11c, CD14, CD4, CD25, CD141, CD20 et CD205. Après deux lavages avec du DPBS 1X, les cellules sont fixées avec la PBS/PFA 1,6% puis perméabilisées avec une solution de PermWash 1X (Becton Dickinson, USA). Les anticorps dirigés contre les molécules intracellulaires (**Annexe 1**) et l'iridium (agent intercalant de l'ADN) dilués dans du PermWash 1X sont alors mis en présence des cellules. Les anticorps sont dirigés contre les molécules intracellulaires suivantes : granzyme B et perforine (Annexe 1). Après deux lavages avec du DPBS 1X, les cellules sont fixées en PBS/PFA 1,6% puis lavées et diluées dans 1ml d'eau Milli-Q (Merk Millipore, USA). Les cellules sont filtrées à l'aide d'un filtre de 35 µm (BD Biosciences), avant l'addition de billes de calibration (EQ™

Four-Element Calibration Beads) (Fluidigm, San Francisco, USA). Chaque échantillon est séparé en deux au moment de l'acquisition. Celle-ci s'effectue au CyTOF (DVS Sciences, Canada) à l'aide du logiciel CyTOF (version 5) et après validation du contrôle qualité de l'appareil.

7. Traitement des données et analyse

Les données de cytométrie de masse ont été normalisées à l'aide de l'algorithme MATLAB Normalizer développé par l'équipe de Rachel Finck ¹⁷². Des billes permettant cette étape de normalisation ont été ajoutées aux échantillons avant l'acquisition au CyTOF. Le signal des billes de calibration contenues dans chaque échantillon est utilisé par l'algorithme pour ajuster le signal mesuré au niveau de chaque échantillon afin de pallier la diminution du signal observée au cours du temps d'acquisition. Les deux répliques de chaque échantillon ont été concaténées à l'aide de l'outil de concaténation de fichiers FCS contenu dans l'application logicielle web Cytobank (Mountain View, CA). L'analyse des données multidimensionnelles générées par la cytométrie de masse peut se faire en utilisant la représentation en nuage de points bidimensionnels (dot-plots). Cependant, pour 33 marqueurs, cela nécessiterait, la génération de 496 dot-plots. Pour s'affranchir de ce type d'analyse (qui prend du temps et qui n'est pas évident à analyser), des algorithmes permettant de réaliser une analyse simplifiée ont été développés. L'analyse *Spanning-tree progression analysis of density-normalized events* (SPADE)¹⁶⁴ permet de générer des arbres constitués de nœuds regroupant des cellules similaires : les nœuds sont liés entre eux en fonction de leur proximité phénotypique. Cet algorithme conserve les données des populations rares en réalisant un sous-échantillonnage densité dépendant. Cette méthode assure une représentation égale des cellules provenant des populations abondantes et des cellules provenant de populations rares. SPADE réalise ensuite un regroupement agglomérant hiérarchique, qui forme des nœuds de cellules proches sur l'espace multidimensionnel. Il réalise des itérations jusqu'à l'obtention du nombre de nœuds demandé. SPADE crée un arbre branché représentant les relations phénotypiques entre les différents nœuds. Il est ensuite possible via une échelle en gradient coloré de visualiser la médiane d'expression de chacun des marqueurs au niveau de chaque nœud. L'analyse SPADE¹⁶⁴ a été réalisées simultanément pour les échantillons de sang et de moelle osseuse de tous les individus, avec les 33 marqueurs.

Les nœuds SPADE générés ont été annotés manuellement. Pour visualiser et intégrer les données obtenues à partir de SPADE, l'application SPADEVizR a été développée au sein de l'unité (Thitchek et al. In preparation). SPADEVizR permet d'identifier 3 types de clusters cellulaires pertinents. Les nœuds abondants sont ceux ayant une abondance cellulaire statistique supérieure à un seuil spécifique (t-test Simple). Les nœuds statistiquement différents entre deux conditions biologiques sont ensuite identifiés par un t-test apparié. Enfin, la corrélation de Spearman entre abondance cellulaire et condition biologique est effectuée.

IV. Résultats

1. Approche expérimentale

L'étude pilote que j'ai réalisé a consisté en la validation de l'approche de cytométrie de masse et sa capacité à révéler des populations myéloïdes dans le contexte de l'infection du macaque cynomolgus par le SIVmac251. La proximité des primates non humains avec l'homme fait de ces animaux des modèles de choix pour l'étude des maladies infectieuses comme le VIH. Ainsi, les ancêtres de l'homme et du macaque ont divergés il y a 25-28 millions d'années, alors que la divergence entre homme et souris a eu lieu il y a 70 millions d'années¹⁷³. De nombreuses espèces de primates africains sont des hôtes naturels du SIV mais ne développent généralement pas de maladie. Au contraire, l'infection des macaques asiatiques, qui ne sont pas des hôtes naturels des lentivirus, par certaines souches du SIV induit une forte charge virale, une déplétion des cellules T CD4+ et des infections opportunistes. Trois espèces de macaques sont habituellement utilisées comme modèle de l'infection par le VIH : le macaque rhesus (*Macaca mulatta*), le macaque à queue de cochon (*Macaca nemestrina*) et le macaque cynomolgus (*Macaca fascicularis*). Chacune de ces espèces possède une histoire évolutive particulière, qui affecte le devenir de l'infection par le SIV. Le macaque cynomolgus infecté par le SIVmac251 reproduit la dynamique de déplétion des cellules T CD4+ et la réplication virale observée chez les patients infectés par le VIH-1. Comparé au macaque rhesus, le taux de progression de la maladie des cynomolgus infectés par le SIVmac251 ainsi que la progression vers la phase SIDA sont plus lents¹⁷⁴. Le cynomolgus est donc un modèle de choix pour étudier la phase aiguë et chronique de l'infection. De plus, la pharmacocinétique et la pharmacodynamique des traitements antirétroviraux est proche

de celle observée chez l'homme¹⁶⁰. Néanmoins, le SIVmac251 est génétiquement plus proche du VIH-2 que du VIH-1 (**Figure 1**). Le SIVmac251 n'est pas sensible à certains inhibiteurs de protéases, de la transcriptase inverse et de l'intégrase. Les macaques cynomolgus proviennent de l'île Maurice, où un petit groupe d'animaux fondateurs a été introduit il y a environ 500 ans par l'homme. Seulement sept haplotypes de CMH ont été identifiés sur cette colonie d'animaux. Ainsi, l'effet de l'haplotype du CMH de classe I sur l'infection par le SIVmac251 a pu être évalué. L'haplotype H6 est associé à un contrôle significatif de l'infection, alors que les animaux positifs pour l'haplotype H5 échouaient à contrôler la virémie comparé aux autres animaux de la cohorte¹⁷⁵. Pour cette raison nous avons exclu les animaux porteurs de l'haplotype H6 durant l'étude pilote.

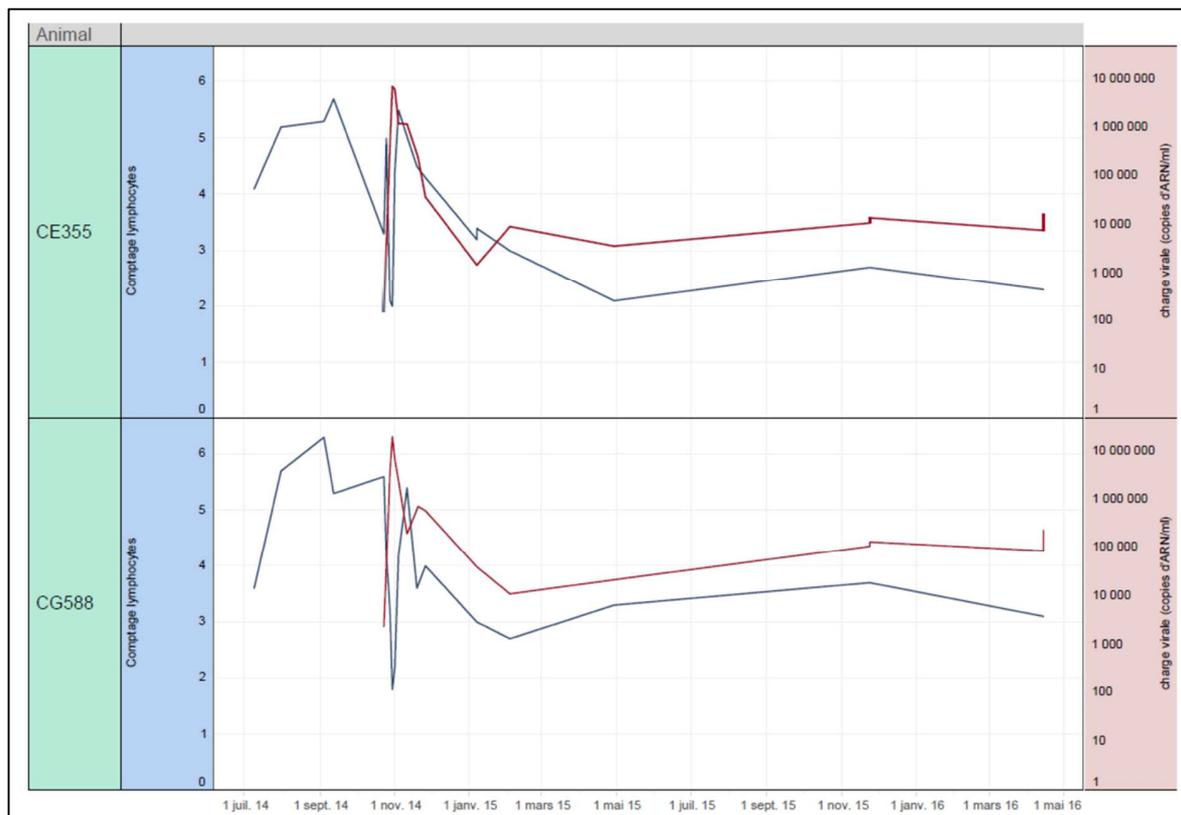


Figure 15 : Suivi longitudinal du comptage lymphocytaire sanguin (bleu) et de la charge virale plasmatique (rouge) chez les deux macaques cynomolgus infectés par le SIVmac251.

Notre étude pilote repose sur trois macaques sains et deux macques infectés chroniquement par le SIVmac251 (29 octobre 2014) (**Figure 15**). Les approches statistiques réalisées sur ce petit échantillon ne peuvent pas être généralisées et sont

utilisées pour centrer l'analyse sur certaines populations cellulaires.

2. Mise au point du marquage des cellules myéloïdes

Pour évaluer l'impact de l'infection chronique sur les populations myéloïdes de la moelle osseuse et du sang périphérique, il convient de caractériser ces deux compartiments. Pour répondre à ce besoin un panel de 33 anticorps a été mis au point pour la cytométrie de masse (**Figure 16**). La première partie de mon projet consistait en la sélection des marqueurs pour explorer la diversité des populations myéloïdes dans le contexte de l'infection SIV. J'ai donc testé la réactivité de plus de soixante-dix clones d'anticorps (données non montrées) pour les épitopes portés par les cellules hématopoïétiques du macaque *Cynomolgus*. Les 33 anticorps anti-humains utilisés réagissent de façon croisée sur les cellules de macaque, comme le confirme l'analyse hiérarchique manuelle (**Figure 17**).

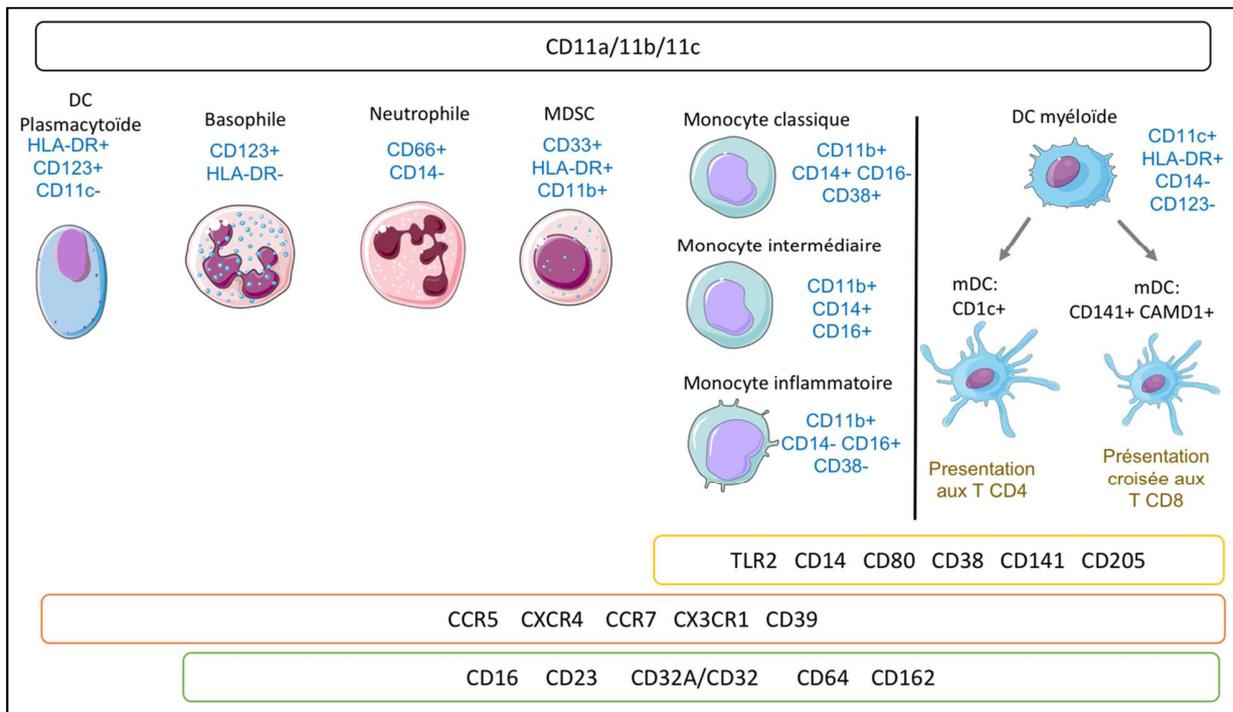


Figure 16 : Représentation des cellules myéloïdes déterminées par des marqueurs phénotypique (bleu) et analysés suivant des marqueurs d'activation, de différenciation et de mobilisation.

3. Caractérisation des populations myéloïdes au repos dans la moelle osseuse et la circulation du macaque *Cynomolgus* sain

A. Analyse hiérarchique multidimensionnelle classique des deux compartiments chez les macaques sains

L'analyse hiérarchique multidimensionnelle est classiquement utilisée en cytométrie en flux pour identifier et caractériser des sous-populations cellulaires sous forme de fenêtre (Figure 17). Cette analyse nous permet de décrire les populations cellulaires présentes dans la moelle osseuse des macaques sains en comparaison de ce qui est connu dans le sang. On observe ainsi des différences entre les populations leucocytaires dans le sang et la moelle osseuse des macaques contrôle (Figure 18).

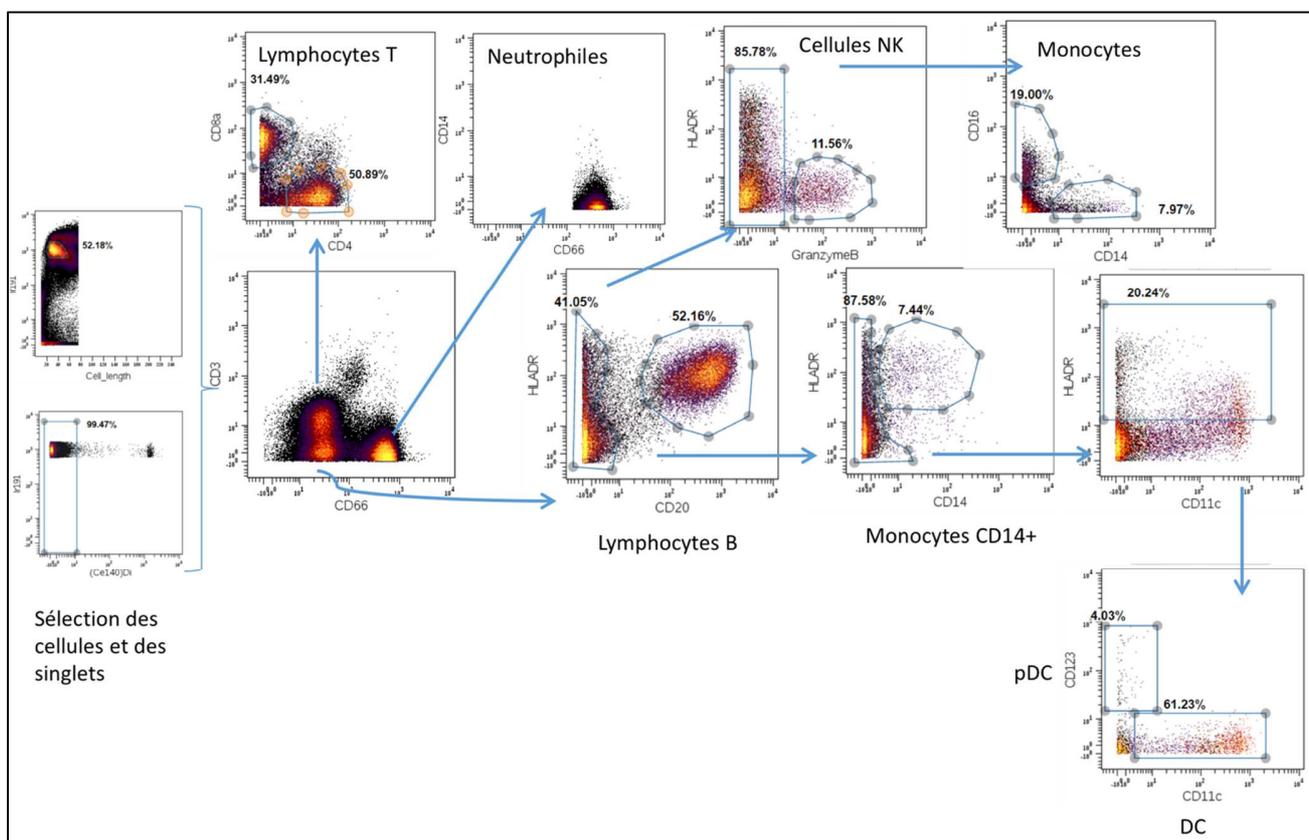


Figure 17 : Fenêtrage hiérarchique classique montré ici dans le sang d'un macaque sain. Les cellules sont sélectionnées à l'aide du marquage à l'iridium (Ir191) puis les billes étalons internes sont exclues avec le Ce140. Le CD3 et CD66 permettent de différencier les populations de neutrophiles et de lymphocytes T. Les populations cellulaires sont ensuite analysées suivant cette stratégie de fenêtrage.

Ces différences sont liées à la fonction hématopoïétique de la moelle osseuse, où les populations cellulaires peu différenciées coexistent avec des cellules matures, circulant dans le sinus veineux. Contrairement au sang, la moelle osseuse héberge des cellules CD45^{-low} (**Figure 18.A**). Ces cellules sont très probablement des adipocytes, des ostéoblastes et des cellules stromales de moelle osseuse, qui participent à l'hématopoïèse¹⁷⁶. Les prélèvements de moelle osseuse présentent en moyenne 20% de lymphocytes T CD3+ chez la macaques de l'étude pilote, alors qu'il représentaient en moyenne 5% des cellules de la moelle osseuse dans une publication de 1998¹⁷⁷. Cette forte proportion peut s'expliquer par une contamination sanguine due à la technique d'aspiration de la moelle osseuse (cytoponction à l'aiguille)¹⁷⁶. Les cellules lymphoïdes et myéloïdes matures ont la possibilité de retourner dans la moelle osseuse, ce qui explique également la présence de lymphocytes T dans ce compartiment. Néanmoins, la moelle osseuse contient peu de LT CD4+ comparé aux LT CD8+ et une forte proportion de LT double négatifs (**Figure 18.B**). Les lymphocytes B CD20+ (LB) sont 3 fois moins nombreux dans la moelle osseuse comparée au sang (**Figure 18.C**). Les LB de la moelle osseuse sont CD32^{low} CD38^{low}, ce qui correspond à des stades précoces de la différenciation B³⁰. Ces deux marqueurs sont plus fortement exprimés dans une sous-population sanguine associées aux LB matures /transitionnels (**Figure 18.D**)³⁰. Néanmoins, l'anticorps anti-CD25 ne permet pas de distinguer des populations de pré-B et B immatures CD25+ présentes dans la moelle osseuse de l'homme³⁰. Les cellules NK du macaque *Cynomolgus* ne peuvent pas être identifiées à l'aide de CD56, qui est également exprimé par les monocytes dans cette espèce. Les cellules CD8+, granzyme B+, HLA-DR- et n'exprimant pas les marqueurs de lignée lymphoïde et myéloïdes ont été considérées comme des cellules NK. Cette population cellulaire est identifiée dans les deux compartiments (**Figure 18.E**).

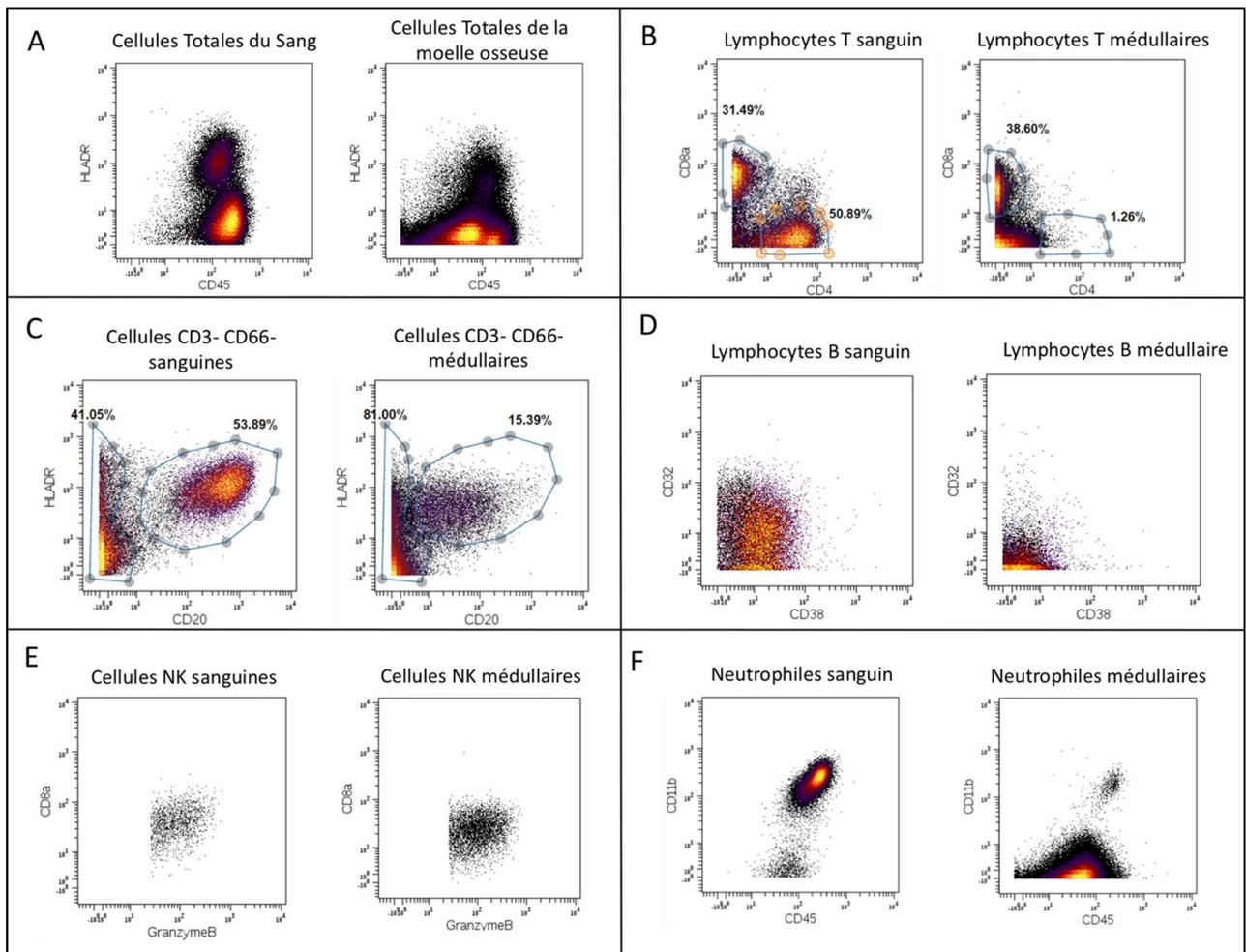


Figure 18 : Analyse par fenêtrage des populations cellulaires du sang et de la moelle osseuse de macaques sains.

Le panel utilisé permet d'identifier différents stades de maturation des neutrophiles. Cette population de cellules myéloïdes CD66+ montre une expression différentielle de CD11b dans ces deux compartiments. Dans la circulation, elles sont $CD11b^{High}$ alors que dans la moelle osseuse elles sont $CD11b^{Low}$ (**Figure 18.F**). Le schéma de différenciation des neutrophiles passe par le stade promyélocytes, n'expriment pas CD11b, puis vers le stade myélocyte et band cell, qui expriment de façon croissante CD11b, dont l'expression devient maximale dans les neutrophiles âgés¹⁷⁸. Cette analyse montre la même trajectoire de développement des neutrophiles que celle observé chez l'homme.

Trois populations de monocytes sont identifiées chez l'homme et le macaque¹⁷⁹ : les monocytes classiques (CD14+ CD16-), les monocytes intermédiaires (CD14+ CD16+) et les monocytes intermédiaires (CD14- CD16+). Au repos, les monocytes intermédiaires sont majoritaires dans la circulation, ce qui est observé dans le sang et la moelle osseuse des macaques sains (**Figure 19.A**). Les monocytes non classiques (CD14- CD16+) représentent une faible proportion des monocytes circulants et médullaires, ce qui a été précédemment décrit¹⁷⁹. Les monocytes intermédiaires (CD14+ CD16+) sont difficilement identifiables dans le sang et la moelle osseuse. Le niveau du marquage par l'anticorps anti-CD16 étant relativement bas pour les monocytes et les DC, l'analyse de ces sous-populations a été complexe. Les mDC sont identifiées par leur expression des marqueurs de ligné négatif (lymphoïde, NK, neutrophiles et monocytes), et le paterne HLA-DR+ CD123- CD11c+. Chez le macaque Rhésus, CD141 ne montre pas le même ne montre pas le même profil d'expression sur les DC que chez l'homme¹⁷⁹

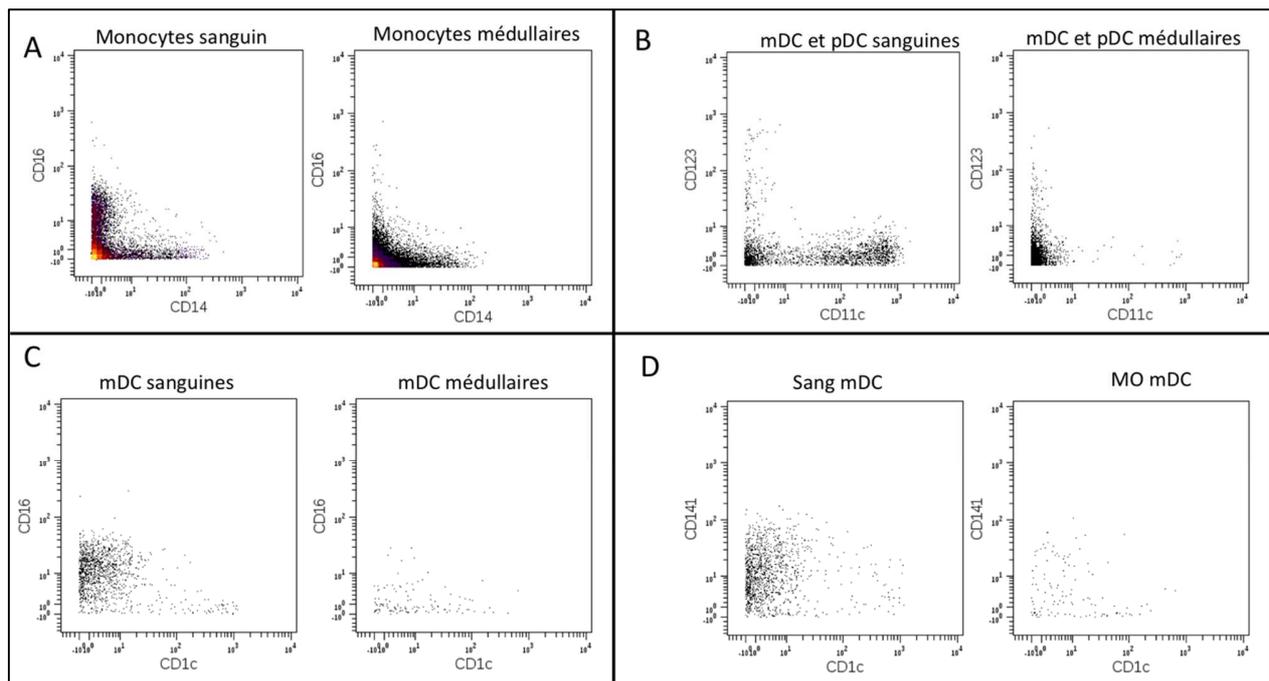


Figure 19 : Distribution des populations de monocytes et de cellules dendritiques myéloïdes (mDC) et plasmacytoïdes (pDC) dans le sang et la moelle osseuse des macaques sains.

D'après la littérature, dans cette espèce deux populations de DC peuvent être identifiées avec CD16 et CD1c¹⁷⁹. Les populations de DC du macaque Cynomolgus sont généralement analysées de la même manière. Avec cette stratégie de fenêtrage il peut y

avoir une superposition des monocytes non classiques et des mDC CD16+. Les mDC CD16+ ne sont pas présentes dans la moelle osseuse et sont difficilement identifiables dans le sang (**Figure 18.C**). Les populations mDC CD1c+ représentent une faible proportion des mDC circulantes comparé aux mDC CD1c-. CD141 est exprimé dans deux populations de mDC : CD1c+ et CD1c- (**Figure 18.C**). Son profil d'expression est donc différent de celui observé chez l'homme certainement à cause des problèmes de réactivité de l'anticorps chez le Cynomolgus. L'expression de CD141 est superposable à celle de CD16. Enfin, les pDC (lin- DR+ CD123+ CD11c-) sont présentes dans la moelle osseuse et le sang. L'analyse par fenêtrage est complexe et biaisée avec 33 marqueurs par cellules. Des algorithmes, comme SPADE, ont donc été développés pour permettre une analyse des populations cellulaires¹⁶⁴.

B. Analyse en clusters SPADE des populations myéloïdes chez le macaque sain

La subjectivité de l'analyse hiérarchique manuelle est problématique pour l'étude de données multidimensionnelles et de populations cellulaires rares. Pour analyser plus finement la complexité des populations cellulaires présentes une approche non supervisée de regroupement est nécessaire. L'algorithme SPADE permet de regrouper des cellules phénotypiquement proches sous forme de 100 clusters de cellules en utilisant les 33 marqueurs du panel. L'annotation des clusters (**Figure 20**) a été réalisée de la façon suivante en se basant sur les stratégies utilisées en cytométrie en flux :

- Neutrophiles (CD3- CD66+ CD14-)
- Basophiles (CD3- CD66- CD123+ HLA-DR-)
- Lymphocytes T (CD3+ CD66-)
- Cellules NK (CD3- CD66- CD20- HLADR- CD8+)
- Lymphocytes B (CD20+ HLA-DR+)
- Monocytes (CD3- CD66- CD20- CD14+ HLA-DR+)
- pDC (CD3- CD66- CD20- CD14- HLA-DR+ CD123+ CD11c-)
- mDC (CD3- CD66- CD20- CD14- HLA-DR+ CD123- CD11c+).

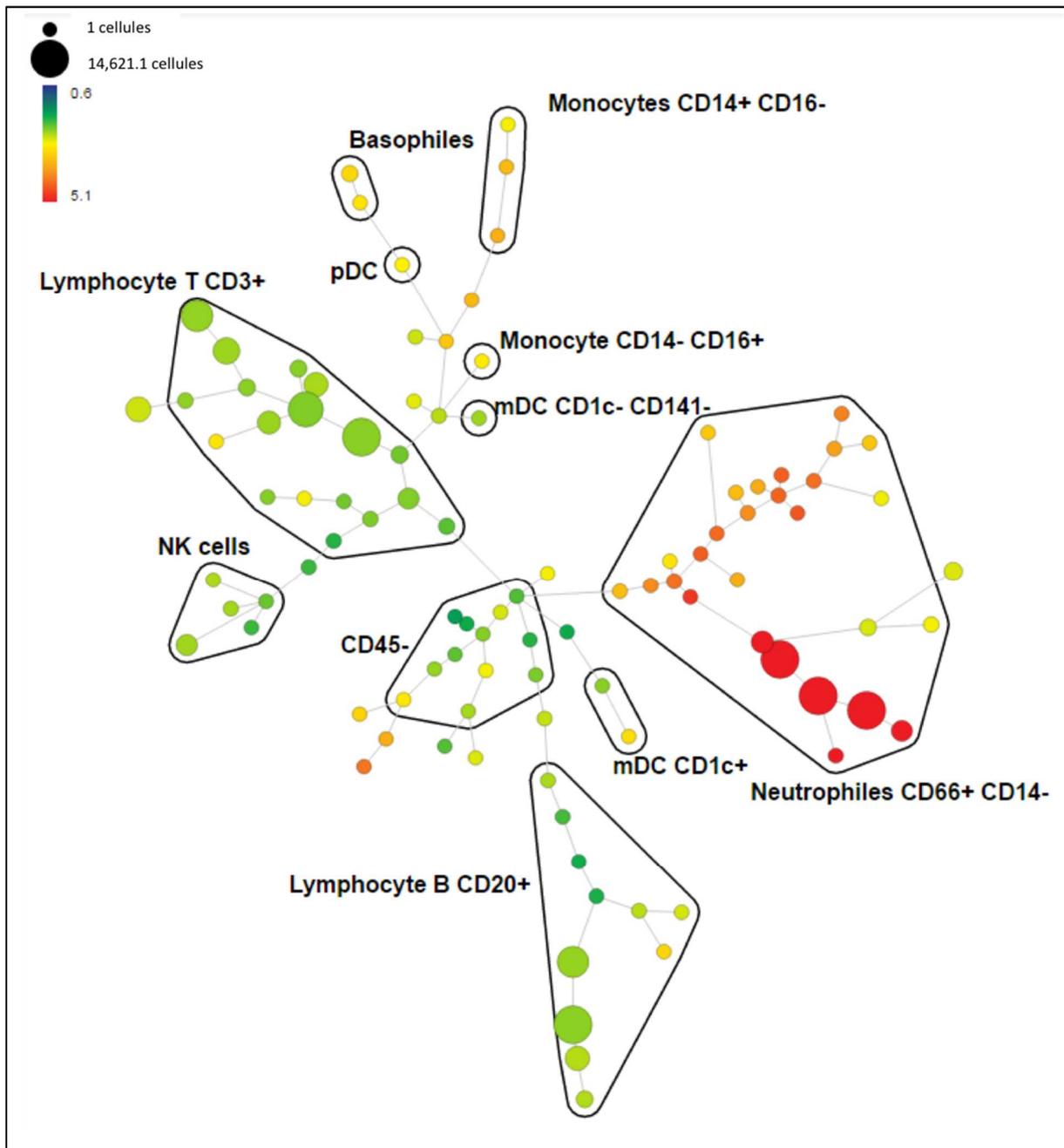


Figure 20 : Clusters obtenus après analyse SPADE¹⁶⁴ réalisée sur l'ensemble des cellules du sang et de la moelle osseuse des macaques *Cynomolgus*. L'arborescence ainsi que la position des nœuds (ie. Clusters) dans l'espace résumant les relations phénotypiques entre les différentes populations cellulaires. La taille de chaque nœud est proportionnelle au nombre de cellules qu'il contient. Ici le gradient de coloration du vert au rouge représente le niveau d'expression de CD66.

Pour identifier et caractériser les clusters pertinents à analyser parmi les 100 clusters une méthode statistique est nécessaire. L'application SPADEVizR développée au sein de l'unité permet d'identifier des clusters significativement abondants dans deux conditions biologiques différentes. Cette application a donc été utilisée pour comparer et décrire les variations d'abondance des populations cellulaires entre moelle osseuse et sang (**Figure 21**). Ces analyses statistiques sont utilisées pour sélectionner des clusters dont la quantité de cellules varie significativement dans deux conditions distinctes (sang et moelle osseuse). Néanmoins cette approche n'est pas représentative car l'échantillon ne contient que 3 macaques sains.

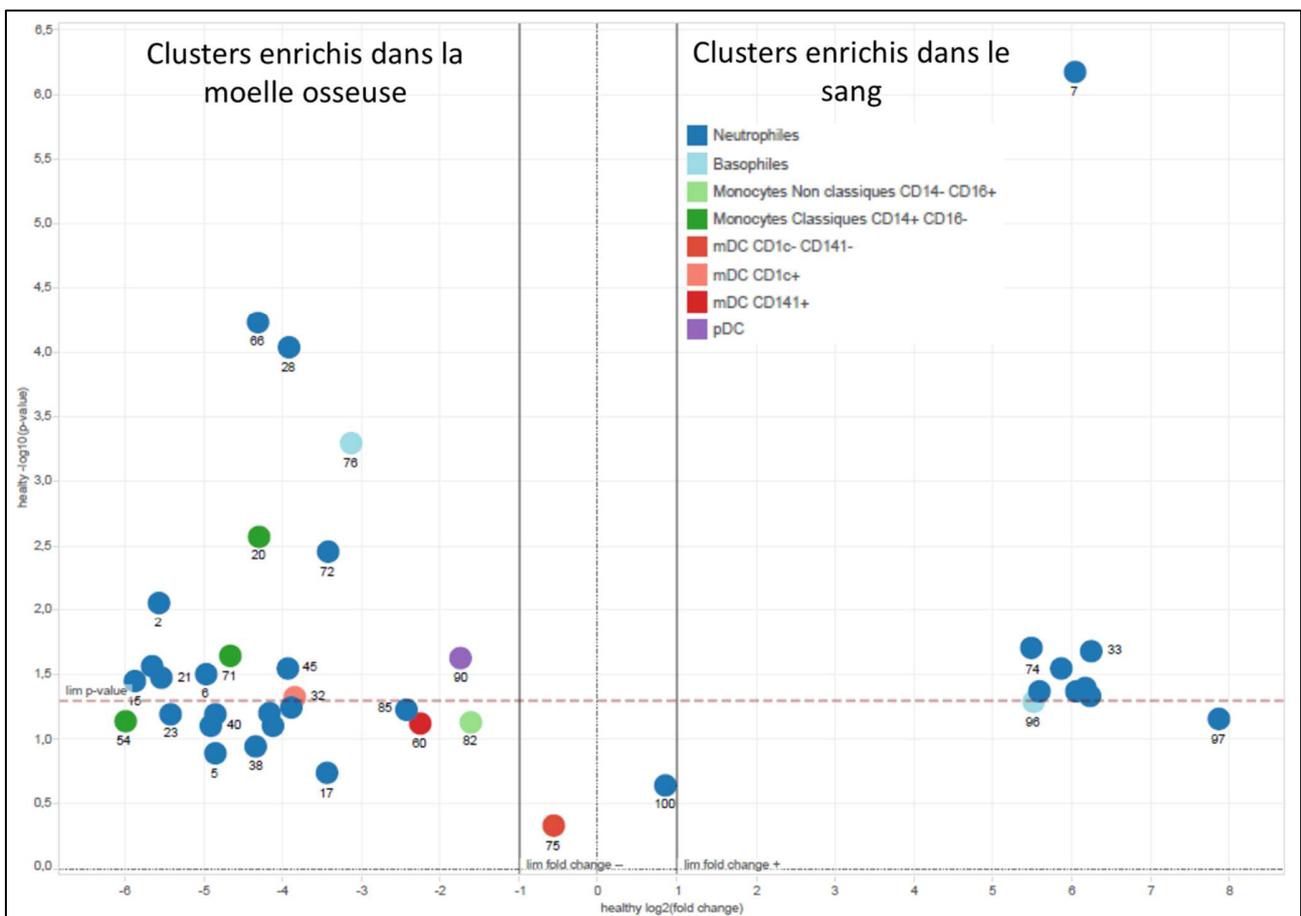


Figure 21 : « Volcano plot » représentant les différences d'abondance des clusters de cellules myéloïdes chez les macaques témoins en fonction de la significativité du t-test ($p < 0.05$). Les clusters situés au-dessus de la limite (pointillés rouges) sont significativement enrichis dans le sang ou la moelle osseuse.

Cette analyse montre que 8 clusters (neutrophiles et basophiles) sont spécifiques du sang, et que 13 clusters (neutrophiles, monocytes classiques, pDC et basophiles) sont plus abondants dans la moelle osseuse. Globalement le niveau d'expression de CD66, CD45, CD32 et de CD11b par les neutrophiles médullaires est plus faible et celui de CXCR4 plus fort, caractéristique de populations moins différenciées¹⁷⁸. Chez l'homme, au cours de la myélopoïèse les précurseurs des neutrophiles perdent progressivement l'expression de CXCR4. Ce chimiorécepteur permet la maturation et l'adhésion des précurseurs myéloïdes aux cellules stromales exprimant CCL12¹⁸⁰. Le vieillissement et la maturation des neutrophiles s'accompagnent également d'une augmentation d'expression de CD11b, CD32 et CD66¹⁸¹. CD11b est une intégrine qui permet notamment aux leucocytes d'adhérer à l'endothélium vasculaire afin d'effectuer la diapédèse. CD32 (FcγRII) est un récepteur de la portion Fc des immunoglobulines G (IgG) qui permet aux neutrophiles matures de phagocyter des complexes immuns, des agents infectieux opsonisés et entraîne également leur dégranulation¹⁸². Ainsi, l'augmentation d'expression de CD32 et CD11b avec la maturation des neutrophiles est certainement corrélée à leurs capacités fonctionnelles.

Après identification des clusters de cellules, qui semblent spécifiques du sang ou de la moelle osseuse, il convient d'analyser le niveau d'expression des différents marqueurs pour caractériser finement ces populations cellulaires. Pour visualiser facilement les profils d'expression des 100 clusters créés dans SPADE, nous avons utilisé une représentation « heatmap » (**Figure 22**). La heatmap représente la moyenne relative des intensités médianes d'expression des marqueurs, tout en effectuant un regroupement hiérarchique des clusters et des marqueurs. Par cette approche, les clusters sont organisés au sein d'un dendrogramme suivant leurs relations phénotypiques et les marqueurs sont organisés suivant leur degré de co-expression. Les intensités de marquage sont classées en 5 catégories uniformes calculées sur les rangs d'expression du 1er au 99^{ème} percentile. Il est alors possible de comparer facilement les sous-populations cellulaires dans des échantillons différents.

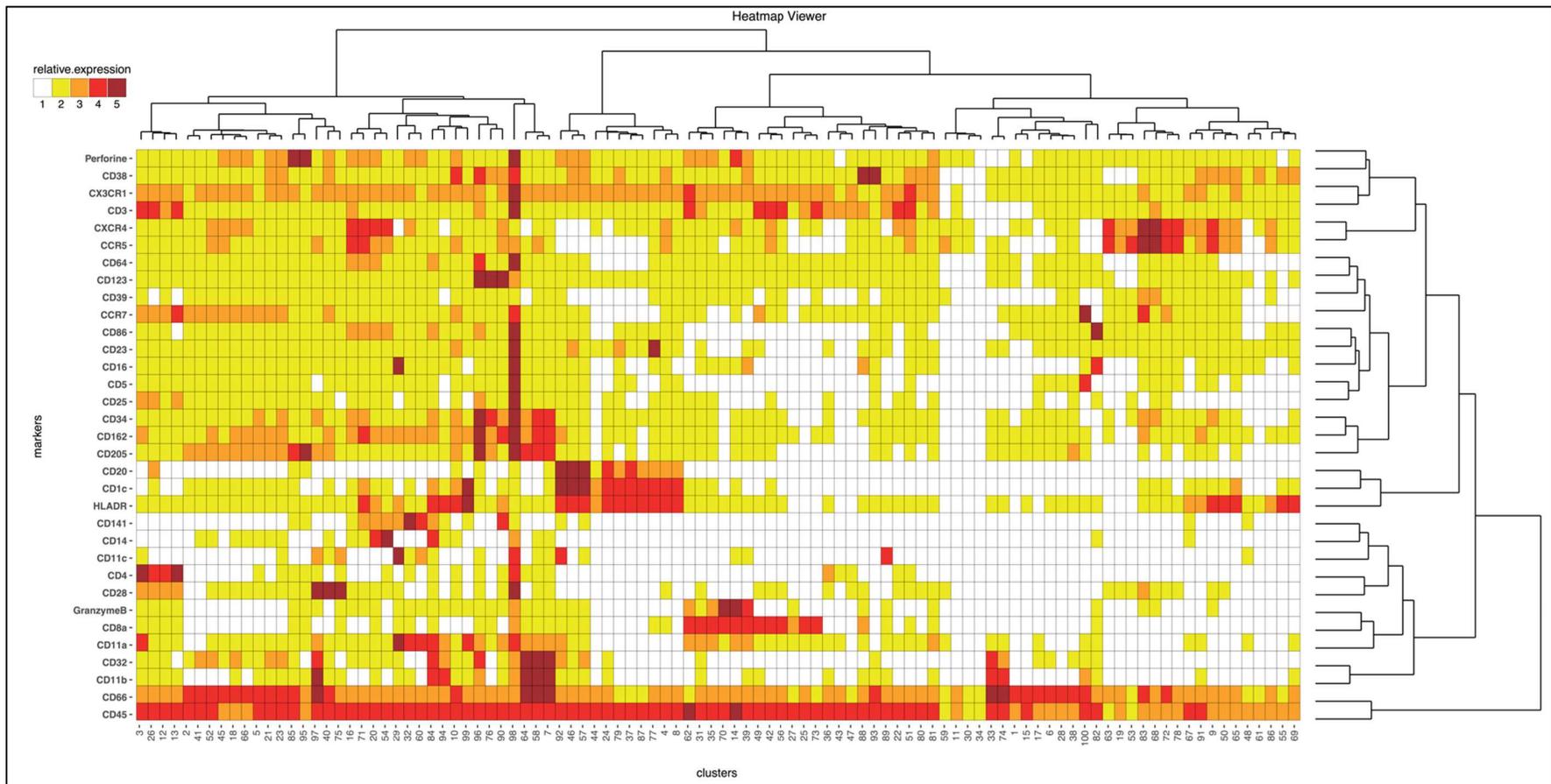


Figure 22 : Heatmap représentant le niveau d'expression des 33 marqueurs pour chacun des 100 clusters obtenus dans le sang et la moelle osseuse des macaques sains. Les intensités de marquage sont classées en 5 catégories uniformes calculées sur les rangs d'expression du 1^{er} au 99^{ème} percentile. Les clusters sont organisés au sein d'un dendrogramme suivant leurs relations phénotypiques et les marqueurs dans un dendrogramme montrant leur degré de co-expression.

La moelle osseuse du Cynomolgus est principalement composée de populations de neutrophiles immatures $CD66^{Mid}CD11b^{low/-}CXCR4^{Mid} CCR5^{Mid}$ ¹⁸³. Ces populations sont certainement des métamyélocytes ou des cellules en bandes (« band cells ») en cours de différenciation¹⁸¹. Une autre population de neutrophiles spécifique de la moelle osseuse $CD66^{Mid}CD11b^{Mid}$ n'exprime ni CCR5 et CXCR4 à sa surface. Cette dernière est certainement sur le point de quitter la moelle osseuse pour la circulation sanguine¹⁸⁴. Ces populations immatures coexistent avec des neutrophiles âgés $CD66^{Hight}CD11b^{Hight}CXCR4^{Hight}$ représentés par le cluster 72¹⁷⁸. Cette population, peu représentée dans le sang, est 12 fois plus importante dans la moelle osseuse (**Figure 21**). Chez l'homme, le chimiorécepteur CXCR4 permet également la migration vers la moelle osseuse et son expression augmente avec l'âge des neutrophiles circulants. Les neutrophiles sénescents sont ainsi éliminés par les macrophages médullaires et digestifs par un mécanisme appelé efférocytose¹⁸⁵.

Comme chez l'homme, les neutrophiles circulant du Cynomolgus peuvent être divisés en deux sous populations suivant le niveau d'expression de CD66, CD11b et CD32 : $CD66^{Hight}CD11b^{Hight} CD32^{Hight}/ CD66^{Mid}CD11b^{Mid}CD32^{Low}$ ¹⁷⁸. Chez l'homme, les neutrophiles $CD66^{Hight}CD11b^{Hight}CD32^{Hight}$ sont les stades terminaux de différenciation¹⁸¹. Cette population peut être découpée en deux sous-populations suivant la présence ou non de CCR5 à leur surface. Le chimiorécepteur CCR5 permet aux neutrophiles de migrer vers les tissus inflammatoires¹⁸⁵. La majeure partie des neutrophiles circulant chez le Cynomolgus expriment CCR5. Le pool de neutrophiles apte à migrer vers le tissu inflammatoire est donc important. La population $CD66^{Mid}CD11b^{Mid}CD32^{Low}$, certainement moins âgée, possède la particularité d'exprimer HLA-DR et faiblement CXCR4. Le cluster 100 ne varie pas en abondance dans les deux compartiments (**Figure 21**). Cette population $CD66^{Hight} CCR7^{+}$ montre une expression différentielle de CD11b et CD32 suivant sa localisation. Dans la moelle osseuse ces cellules sont moins différenciées et sont $CD11b^{low}CD32^{Low}$. En contraste, ces neutrophiles sont $CD11b^{Hight}CD32^{Hight}$ dans la circulation sanguine, signant une maturation plus avancée. Le récepteur aux chimiokines CCR7, permettant la migration vers les organes lymphoïdes secondaires, est exprimé quel que soit le compartiment étudié. Cette

population, capable de migrer vers les nœuds lymphatiques, est certainement liée aux capacités de migration des neutrophiles dans les organes lymphoïdes et à leur probable rôle régulateur dans la réponse immune¹⁸⁴.

Le cluster 76, qui est formé de basophiles, est également spécifique de la moelle osseuse. Cette population médullaire exprime faiblement CD11b, comme les neutrophiles de ce compartiment. Le cluster 76 est remplacé par dans le sang par le cluster 96 constitué, également composé de basophiles, plus différenciés HLA – DR^{Hight}, CD123^{Hight}, CD38^{Hight}, CCR5^{Mid}.

Deux clusters de monocytes classiques $CD14^{Mid/Hight} HLA - DR^{Mid}$ sont plus abondants dans la moelle osseuse. Ils expriment fortement CCR5 et CXCR4, comme les autres populations myéloïdes en cours de différenciation. Le niveau d'expression de HLA-DR de ces monocytes augmente dans le sang. Ces deux clusters montrent un niveau d'expression de CD14 différent. Dans un modèle cynomolgus, il a été montré que les monocytes classiques sont produits dans la moelle osseuse et se différencient dans la circulation en monocytes intermédiaires puis en monocyte non classique (**Figure 10**)¹⁷⁹. Les monocytes non classiques sont représentés dans le sang par le cluster 82, qui est CD16^{Hight} CD86^{Hight} CCR5⁻, CXCR4⁻.

Enfin une population de pDC est également plus abondante dans la moelle osseuse (**Figure 21**). Le cluster 90 exprime plus fortement CD123, plus faiblement HLA-DR CD11a et CD11b dans la moelle osseuse que dans la circulation. Comme les autres cellules myéloïdes médullaires l'expression de CXCR4 est très forte pour les pDC. Ce marqueur disparaît ensuite dans les pDC circulantes. Chez le Cynomolgus, les pDC expriment CD141 comme une sous population de mDC. Ces observations, déjà effectuées chez l'homme, montrent un processus de différenciation des pDC depuis la moelle osseuse vers le sang similaire chez le Cynomolgus.

Le modèle Cynomolgus montre donc des dynamiques de différenciation et des populations myéloïdes similaires de celles observés chez l'homme. L'analyse s'est focalisée sur les différences majeures entre ces deux compartiments chez le macaque Cynomolgus. Nous allons maintenant étudier l'impact de l'infection chronique au SIV sur ces populations myéloïdes.

4. Impact de l'infection SIV chronique sur les populations myéloïdes médullaires et circulantes.

La moelle osseuse des macaques infectés chroniquement par le SIV est globalement appauvrit en populations hématopoïétiques, au profit des cellules CD45⁻ (**Figure 23**). Cela est observé chez l'homme, où, avec le vieillissement, les populations hématopoïétiques sont progressivement remplacées par du tissu adipeux¹⁸⁶. L'inflammation chronique provoquée par l'infection persistante au HIV entraîne également un vieillissement prématuré du système immunitaire¹⁵. Les populations de neutrophiles et de lymphocytes T médullaires sont les plus touchées par l'infection au SIV. Les populations de neutrophiles médullaires CD66^{Mid}CD11b⁻CXCR4^{Mid} précédemment identifiées (clusters 5, 17, 18, 21, 23 et 41) sont moins abondantes chez les macaques infectés (**Figure 23 et 24**). Il y a donc un appauvrissement en neutrophiles immatures. De façon intéressante, les populations de neutrophiles circulants montrent un profil proche de celui de la moelle osseuse au repos. Les sous populations matures CD66^{High}CD11b^{High}CD32^{High} (clusters 7, 58, 64, 84, et 97) disparaissent totalement du sang alors qu'elles représentaient les neutrophiles circulants les plus abondants au repos (**Figure 23 et 24**). Le cluster 33 de neutrophiles matures est 128 fois moins abondant dans la circulation des macaques infectés. L'infection provoque une diminution globale de l'expression de CD11b et une augmentation de CD32 et CXCR4 caractéristique des neutrophiles immatures¹⁷⁸. Les neutrophiles circulants sont certainement des cellules immatures (métamyélocytes, cellules en bandes) caractéristiques d'un processus inflammatoire évolutif, qui mobilise les cellules médullaires¹⁸¹.

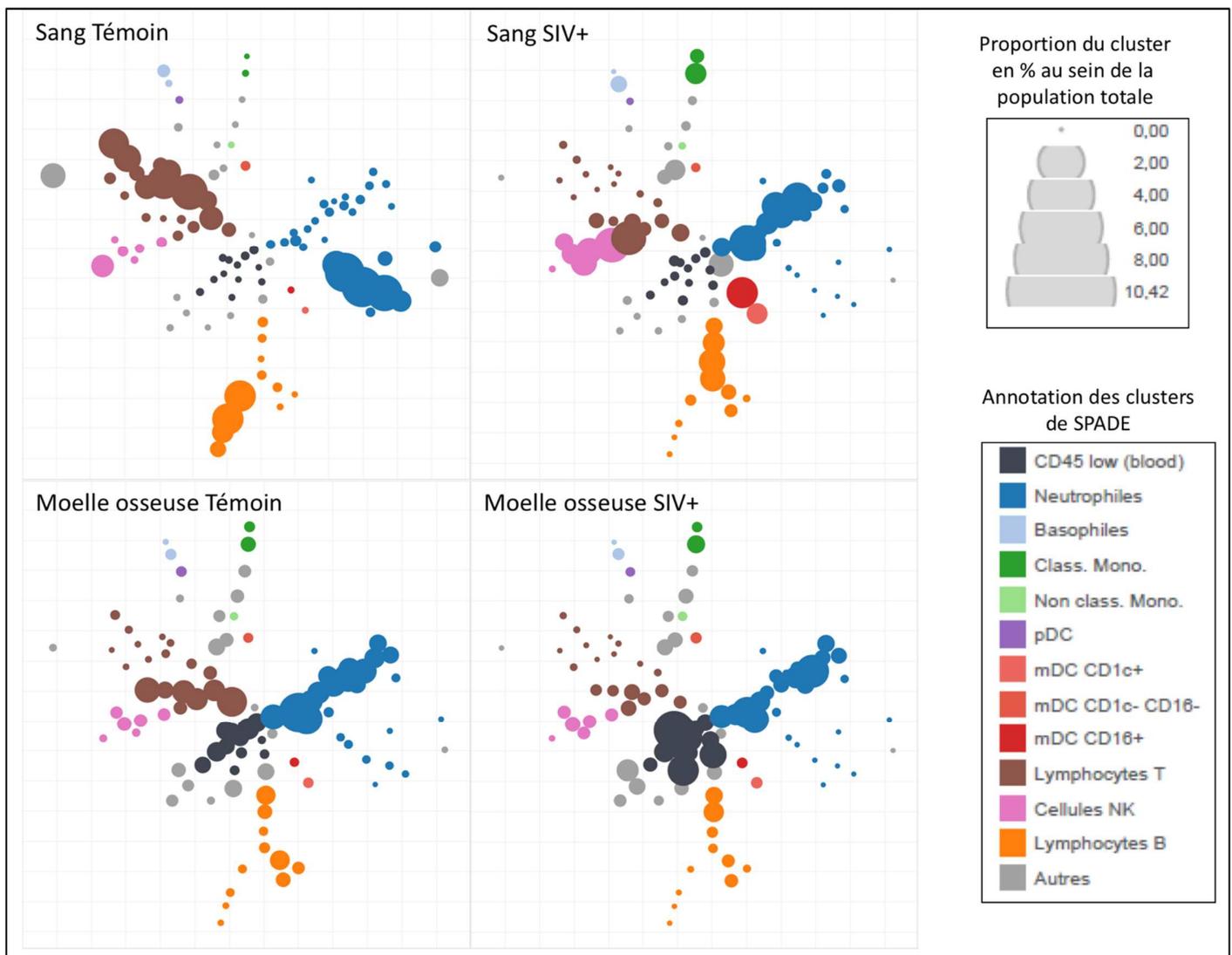


Figure 23 : Impact de l'infection par le SIV sur les populations myéloïdes médullaires et circulantes des macaques cynomolgus. La représentation SPADE montre les différents clusters (points) dont la taille est proportionnelle à la moyenne du pourcentage de cellules qui les composent (Témoins n=3, SIV+ n=2). Chacune des sous-populations leucocytaires est indiquée par une couleur. L'infection par le SIV entraîne des changements phénotypiques majeurs des neutrophiles circulants (bleu), qui montrent un profil proche des neutrophiles médullaires. Les neutrophiles différenciés disparaissent de la circulation au cours de l'infection. L'infection entraîne également un appauvrissement global en leucocytes au profil de cellules CD45⁻ (noir). Le SIV entraîne également la disparition de cellules T CD4⁺ et l'expansion de cellules NK et T CD8⁺, déjà décrites dans la littérature.

Les neutrophiles terminaux $CD66^{Hight}CD11b^{Hight}CCR5^+$ sont certainement mobilisés vers les tissus inflammatoires, comme l'intestin, où la réplication virale et l'inflammation sont intenses. De plus, les neutrophiles $CD66^{Hight}CD11b^{Hight} CCR7^+ CXCR4^-$ (cluster 33) migrant vers les organes lymphoïdes secondaires, disparaissent quasiment de la circulation. L'infection SIV provoque peut-être leur migration vers les nœuds lymphatiques où la réponse immune et la réplication virale ont également lieu. La perte de cette sous-population est légèrement compensée par l'augmentation de la sous-population $CD66^{Hight}CD11b^{Hight} CCR7^+ CXCR4^{Hight}$ (cluster 66). Identifié dans la moelle osseuse au repos, ce cluster est libéré dans la circulation lors de l'infection. Il y a donc une mobilisation de l'ensemble des populations de neutrophiles médullaires dans la circulation certainement pour compenser la migration des neutrophiles vers les tissus inflammatoires. Les basophiles circulants $CD66^{Low}CD11b^{Mid} CD123^{Hight} CXCR4^-$ (cluster 96) sont remplacés par une population de basophiles $CXCR4^{Hight}$ (cluster 76) au cours de l'infection par le SIV (**Figure 23 et 24**). Comme pour les neutrophiles, cette population est mobilisée à partir de la moelle osseuse durant l'infection. Peu de données sont disponibles sur les basophiles dans l'infection SIV et HIV.

Le nombre de monocytes classiques (clusters 20 et 54) et non classiques (cluster 82) médullaires n'est pas augmenté par l'infection. Dans le sang des macaques infectés, les monocytes classiques $CD14^{Mid/Hight}CD16^-CD86^{Mid}$ sont 128 fois plus abondants (**Figure 24**). Il y a donc une expansion de cette population chez le *Cynomolgus* infecté chroniquement comparé à ce qui a été observé chez les patients infectés par le VIH-1⁹¹. De plus, les monocytes non classiques $CD14^-CD16^+CD86^{Hight}$ sont doublés au cours de l'infection, comme ce qui est observé chez l'homme⁹¹.

Deux populations de mDC se trouvent augmentées au cours de l'infection (cluster 32 et 60) (**Figure 24**). La première population est $HLA - DR^{Mid}CD11c^{Hight}CD141^{Hight}CD1c^-CD86^{Low} CXCR4^{Hight}$ (cluster 60) et se retrouve doublée dans la circulation et la moelle osseuse.

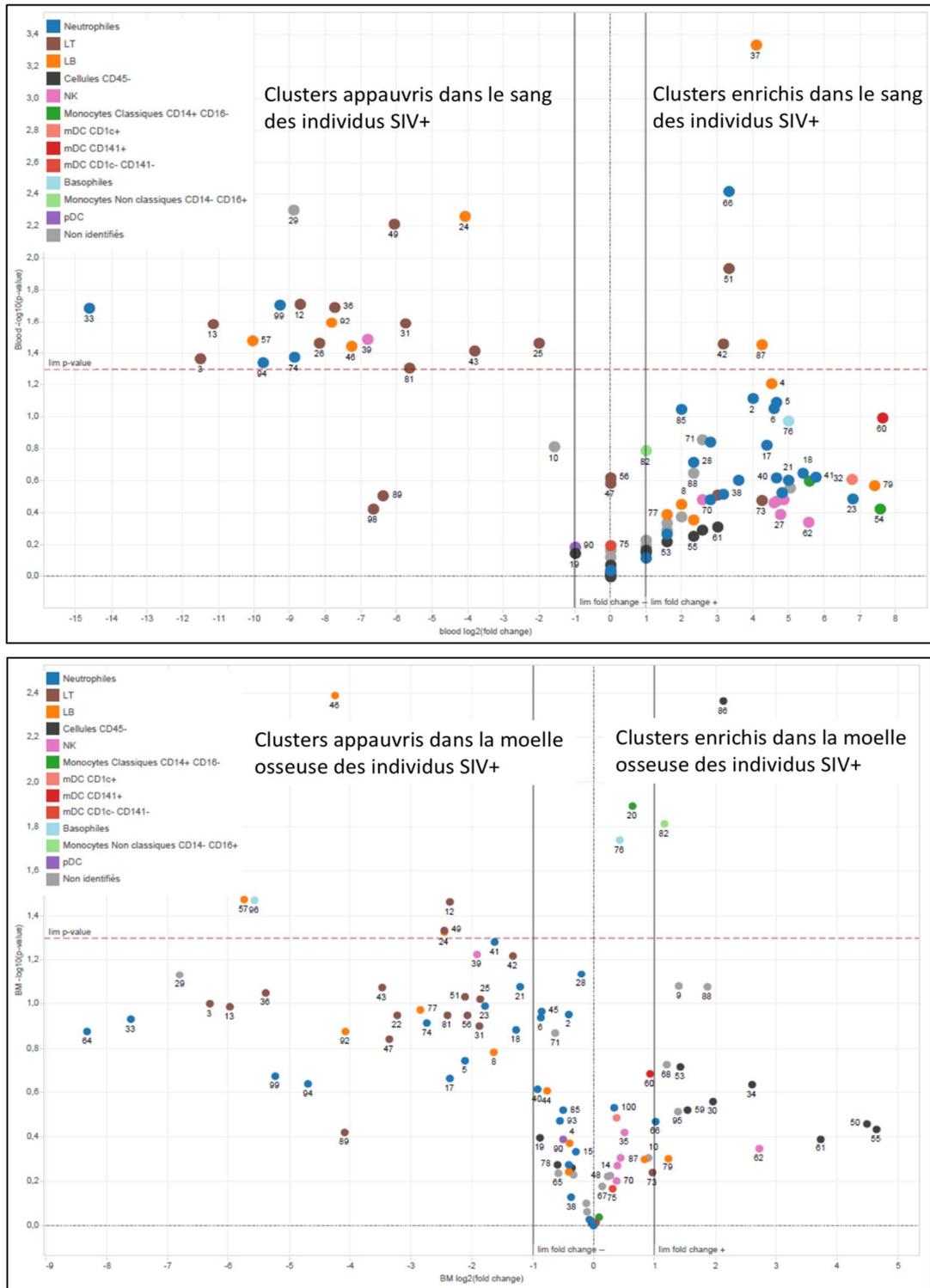


Figure 24 : Variation des sous-populations leucocytaires médullaires et sanguines au cours de l'infection par le SIV. Le « volcano plot » représente l'enrichissement ou l'appauvrissement des différents clusters de leucocytes dans le sang et la moelle osseuse au cours de l'infection par le SIV. Limite de significativité représentée en pointillés rouges (p value < 0,05%).

Cette population de mDC CD1c⁻ CD141⁺ est peut-être capable de réaliser une présentation croisée aux lymphocytes T CD8, mais peu d'études fonctionnelles chez le macaque *Cynomolgus* sont disponibles. Le cluster 32 est aussi doublé dans le sang des macaques virémiques et représente une population HLA – DR^{High} CD11c^{High} CD141^{Mid} CD1c^{High}, qui correspond certainement à la population capable de présentation directe aux lymphocytes T CD4. *Dutertre et al.*⁹¹ montrent des résultats différents chez des patients infectés par le VIH-1 et virémiques, où les populations de mDC sont globalement diminuées. L'auteur montre également que le marqueur CADM1 peut être utilisé chez le macaque pour identifier une population fonctionnellement équivalente aux mDC CD141⁺ ¹⁸⁷.

Enfin, le nombre de pDC (cluster 90) médullaires et circulantes est divisé par deux durant l'infection (**Figure 24**). Chez les macaques infectés les pDC circulantes expriment plus faiblement HLA-DR, CD11b, CCR5 et CD4, et au contraire deviennent CXCR4⁺. Ce patronne correspond à des pDC jeunes, mobilisées récemment de la moelle osseuse. Cette diminution des pDC dans la circulation chez *Cynomolgus* infecté par le SIV a été attribuée à une migration de ces cellules vers les organes lymphoïdes secondaires, où elles s'accumulent.

L'infection par le virus du SIV a également un effet sur la répartition des différentes populations de cellules NK dans ces compartiments. Ainsi la population de NK circulante et différenciée CD8^{Mid} Granzyme B/Perforine^{High} CD16^{Mid} CD38^{High} CX3CR1^{Mid} (Cluster 39) disparaît quasiment de la circulation des macaques infectés par le SIV, au profit de populations normalement retrouvées dans la moelle osseuse au repos (clusters 14, 27, 35, 62 et 70) (**Figure 23 et 24**).

L'infection par le virus du SIV entraîne donc une mobilisation globale des populations myéloïdes et NK depuis la moelle osseuse vers le sang. Les populations matures disparaissent de la circulation, certainement car elles migrent vers les organes myéloïdes secondaires comme les nœuds lymphatiques et les tissus lymphoïdes associés au tube digestif, où la réplication virale est intense¹⁴⁷.

V. Discussion

Pour la première fois chez le macaque *Cynomolgus* les populations myéloïdes de la moelle osseuse et du sang ont été étudiées simultanément, à l'aide d'une technologie de cytométrie de masse utilisant 33 marqueurs. La caractérisation de ce modèle d'étude de l'infection VIH est importante pour affiner notre connaissance de ce modèle. Cette étude pilote met en évidence une modulation globale des populations myéloïdes médullaires et circulantes lors de l'infection chronique de macaques *Cynomolgus* par le SIVmac251.

Au repos, la moelle osseuse et le sang montrent une diversité insoupçonnée des neutrophiles. Il nous est ainsi possible de suivre le processus de maturation des neutrophiles dans ces compartiments. Les observations faites chez le *Cynomolgus* témoins correspondent à ce qui a été précédemment observé chez l'homme. L'infection par le SIV se traduit par une perturbation des populations myéloïdes et NK de ces deux compartiments. L'inflammation chronique caractéristique de cette infection se traduit par une accumulation de cellules CD45-, qui sont certainement des adipocytes¹⁸⁶. Ce phénomène s'observe également lors de l'infection par le VIH chez l'homme où l'inflammation chronique est à l'origine d'une immuno-sénescence précoce¹⁵. Les neutrophiles immatures, qui étaient caractéristiques de la moelle osseuse au repos, se retrouvent enrichis dans la circulation. Ce phénomène est observé lors d'infections bactériennes, où les produits bactériens, comme le LPS, entraînent l'augmentation de l'IL-1, le TNF et le G-CSF, induisant une neutrophilie¹⁸¹. L'inflammation chronique est certainement à l'origine de la libération des neutrophiles médullaires. De plus, les neutrophiles sont impliqués dans la maturation des cellules NK dans la moelle osseuse¹⁸¹. L'étude de la neutropénie congénitale sévère, ainsi que la neutropénie auto-immune chez l'homme montre qu'un déficit global en neutrophiles matures diminue les cellules NK circulantes matures¹⁸⁸. Les cellules NK circulantes sont hypo-fonctionnelles chez ces patients. De façon intéressante, les cellules NK matures disparaissent de la circulation chez les macaques infectés chroniquement par le SIV. La perte des neutrophiles matures dans cette infection pourrait donc participer aux dysfonctions observées sur les cellules NK.

Néanmoins, ces résultats ont été obtenus sur un petit groupe d'animaux, rendant les analyses statistiques impossibles et non représentatives. Le modèle d'étude utilisé, le macaque cynomolgus, est actuellement l'un des modèles les plus pertinents dans l'étude de l'infection VIH et son traitement. Mais les différences génétiques et immunitaires existant entre l'homme et le macaque demanderont de démontrer ces résultats chez l'homme. Ces observations sont faites sur la souche du SIVmac251, dont la génétique est également différente de celle du VIH. L'approche de cytométrie de masse utilisée pour explorer les populations myéloïdes permet une analyse quantitative et simultanée de 33 marqueurs, ainsi qu'une analyse à l'échelle unicellulaire ou des clusters. Mais la technique de fixation des cellules, permettant de préserver les polynucléaires, a l'inconvénient de dénaturer les épitopes qui seront reconnues par les anticorps. Additionné avec le problème de réactivité croisée des anticorps, qui sont construits pour reconnaître des motifs antigéniques humains, la conception de panel d'anticorps est complexe. Les niveaux d'expression des marqueurs ne sont donc pas comparables entre hommes et macaques. De plus la cytométrie de masse est une technique destructrice de cellules étudiées et demande une grande quantité de cellules. Seulement 20% des cellules initialement préparées pourront être analysées¹⁷⁰. Les résultats obtenus sont également à considérer suivant la méthode d'analyse SPADE. Cet algorithme réalise un sous-échantillonnage densité dépendante qui permet de préserver les populations rares mais qui entraîne une perte d'information¹⁸⁹.

Mon projet de thèse universitaire aura pour objectif d'étudier les altérations des populations myéloïdes au cours de l'infection, ainsi que leurs impacts sur l'inflammation chronique et la persistance du SIV dans l'organisme. Ce projet se déroulera dans le cadre du programme P-VISCONTI où 66 macaques Cynomolgus seront séparés en 5 groupes suivant le moment où le traitement sera initié. Les analyses faites pourront donc être à nouveau effectuées sur un groupe plus important d'animaux, répondant au principal point faible de l'étude pilote. D'autres compartiments comme les nœuds lymphatiques mésentériques ou encore l'intestin seront étudiés pour vérifier l'hypothèse d'une migration des cellules myéloïdes vers les tissus et les organes lymphoïdes secondaires. Durant mon master 2 j'ai également développé une technique d'extraction et de fixation des cellules hématopoïétiques intestinales, permettant de préserver les polynucléaires et

certainement les mastocytes. De plus, les populations de cellules myéloïdes modulées par l'infection SIV et son traitement seront analysées d'un point de vue fonctionnelle. Des techniques de cytométrie en flux pour la détection de cytokines intracellulaires après stimulation seront donc utilisées. Pour localiser au niveau tissulaire les populations identifiées par cytométrie de masse, une technique d'histo-cytométrie sera également mise en œuvre. Une méthode de tri cellulaire associée à une co-culture de cellules myéloïde et de cellules NK permettra de tester l'hypothèse du rôle régulateur, des cellules myéloïdes, sur cette population majeure de l'immunité antivirale. Enfin, les observations faites sur ces populations chez le macaque seront confirmées chez l'homme, grâce à des prélèvements de donneurs témoins, de patients infectés par le VIH sous traitement ou non et des patients de la cohorte VISCONTI.

VI. Annexes

Metal	Anticops	Company	clone Mac	Cytof optimal μ /well
141Pr	CD66 (a,b,c,e)	miltenyi	TET2	0,3
142Nd	HLA-DR	BD	L243	0,25
143Nd	CD3	BD	SP34.2	3
144Nd	CD64	BD	10.1	2
145Nd	CD8	BD	RPAT8	1
146Nd	CD45	BD	D058-1283	0,5
147Sm	CD123	BD	7G3	1
148Nd	Granzyme B	AbD serotec	GB11	1
149Sm	CD11a	BD	HI111	1
150Nd	CD11b	BD	ICRF144	1
151Eu	CD38	Stem cell	AT-1	1,5
152Sm	CD16	BD	3G8	2,7
153Eu	CD23	B. Coulter	9P25	2,7
154Sm	CD86	BD	IT2.2	2,5
155	CD32	BD	FLI8.26	1
156Gd	CD162	BD	KPL-1	1,5
159Tb	CCR7 (CD197)	biolegend	G043H7	1
160Gd	CD5	biolegend	UCHT2	1
161Dy	CD1c	Biotechne	AF5910	1
162	CX3CR1	Ozyme	2A9-1	1,5
163Dy	CD34	BD	563	1,5
164Dy	CD184 (CXCR4)	BD	12G5	1
165Ho	CD39	Ebioscience	eBioA1	1
166Er	CD195 (CCR5)	BD	3A9	1,5
167Er	CD28	BD	CD28.2	2,7
168Er	CD11c	Biolegend	3.9	2,5
169Tm	CD33	DVS	WM53	2,5
170Er	CD14	BD	M5E2	1,5
171Yb	CD4	BD	L200	2,5
172	CD25	Miltenyi	4E3	2,5
173Yb	CD141	DVS	1A4	1
174Yb	CD20	BD	2H7	2
175	Perforin	Mabtech	PF-344	2,5
176	CD205	BD	MG38	1,5

Annexe 1: Panel d'anticorps utilisé pour le marquage des cellules.

VII. Bibliographie

1. F, B.-S. The early years of HIV research: integrating clinical and basic research. *Nat Med* **9**, 6 (2003).
2. Barre-Sinoussi, F., Ross, A. L. & Delfraissy, J.-F. Past, present and future: 30 years of HIV research. *Nat Rev Micro* **11**, 877–883 (2013).
3. Barre-Sinoussi, F. *et al.* Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* **220(4599)**, 868–71 (1983).
4. Dalglish, A. G. *et al.* The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus. *Nature* **312**, 763–7
5. Samson, M. *et al.* Resistance to HIV-1 infection in caucasian individuals bearing mutant alleles of the CCR-5 chemokine receptor gene. *Nature* **382**, 722–5 (1996).
6. Feng, Y., Broder, C. C., Kennedy, P. E. & Berger, E. A. HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor. *Science (New York, N.Y.)* **272**, 872–7 (1996).
7. Clavel, F. *et al.* Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS. *Science (New York, N.Y.)* **233**, 343–6 (1986).
8. Sharp, P. M. & Hahn, B. H. Origins of HIV and the AIDS pandemic. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* **1**, a006841 (2011).
9. Jin, M. J. *et al.* Mosaic genome structure of simian immunodeficiency virus from west African green monkeys. *The EMBO journal* **13**, 2935–47 (1994).
10. Apetrei, C. *et al.* Kuru experiments triggered the emergence of pathogenic SIVmac. *AIDS* **20**, 317–321 (2006).
11. Rabson, A. B. & Martin, M. A. Molecular organization of the AIDS retrovirus. *Cell* **40**, 477–480 (1985).

12. Hirsch, V. M., Olmsted, R. A., Murphey-Corb, M., Purcell, R. H. & Johnson, P. R. An African primate lentivirus (SIVsm) closely related to HIV-2. *Nature* **339**, 389–92 (1989).
13. Taylor, B. S., Sobieszczyk, M. E., McCutchan, F. E. & Hammer, S. M. The Challenge of HIV-1 Subtype Diversity. <http://dx.doi.org.gate2.inist.fr/10.1056/NEJMra0706737> (2009).
14. Fischl, M. A. *et al.* The efficacy of azidothymidine (AZT) in the treatment of patients with AIDS and AIDS-related complex. A double-blind, placebo-controlled trial. *The New England journal of medicine* **317**, 185–91 (1987).
15. Nasi, M. *et al.* Aging with HIV infection: A journey to the center of inflammAIDS, immunosenescence and neuroHIV. *Immunology Letters* **162**, 329–333 (2014).
16. Connor, E. M. *et al.* Reduction of maternal-infant transmission of human immunodeficiency virus type 1 with zidovudine treatment. Pediatric AIDS Clinical Trials Group Protocol 076 Study Group. *The New England journal of medicine* **331**, 1173–80 (1994).
17. Auvert, B. *et al.* Randomized, controlled intervention trial of male circumcision for reduction of HIV infection risk: the ANRS 1265 Trial. *PLoS medicine* **2**, e298 (2005).
18. Grant, R. M. *et al.* Preexposure chemoprophylaxis for HIV prevention in men who have sex with men. *The New England journal of medicine* **363**, 2587–99 (2010).
19. Chun, T. W. *et al.* Relationship between pre-existing viral reservoirs and the re-emergence of plasma viremia after discontinuation of highly active anti-retroviral therapy. *Nature medicine* **6**, 757–761 (2000).
20. Jaafoura, S. *et al.* Progressive contraction of the latent HIV reservoir around a core of less-differentiated CD4⁺ memory T Cells. *Nature communications* **5**, 5407 (2014).
21. Finzi, D. Identification of a Reservoir for HIV-1 in Patients on Highly Active Antiretroviral Therapy. *Science* **278**, 1295–1300 (1997).
22. Buzon, M. J. *et al.* HIV-1 persistence in CD4⁺ T cells with stem cell-like properties. *Nature Medicine* **20**, 139–42 (2014).
23. North, T. W. *et al.* Viral sanctuaries during highly active antiretroviral therapy in a nonhuman primate model for AIDS. *Journal of virology* **84**, 2913–2922 (2010).
24. Bourry, O. *et al.* Effect of a short-term HAART on SIV load in macaque tissues is dependent on time of initiation and antiviral diffusion. *Retrovirology* **7**, 78 (2010).

25. Damouche, A. *et al.* Adipose Tissue Is a Neglected Viral Reservoir and an Inflammatory Site during Chronic HIV and SIV Infection. *PLoS Pathogens* **11**, 1–28 (2015).
26. George, M. D. & Asmuth, D. M. Mucosal immunity in HIV infection : what can be done to restore gastrointestinal-associated lymphoid tissue function ? 275–281 (2014). doi:10.1097/QCO.0000000000000059
27. Griffin, G. E. Malabsorption, malnutrition and HIV disease. *Bailliere's Clinical Gastroenterology* **4**, 361–373 (1990).
28. Veazey, R. S. *et al.* Gastrointestinal tract as a major site of CD4+ T cell depletion and viral replication in SIV infection. *Science (New York, N.Y.)* **280**, 427–31 (1998).
29. Brenchley, J. M. *et al.* CD4+ T cell depletion during all stages of HIV disease occurs predominantly in the gastrointestinal tract. *The Journal of experimental medicine* **200**, 749–59 (2004).
30. Paul, W. E. *Fundamental immunology*. (Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins, 2013).
31. Dandekar, S., George, M. D. & Bäumlér, A. J. Th17 cells, HIV and the gut mucosal barrier. *Current opinion in HIV and AIDS* **5**, 173–8 (2010).
32. Favre, D. *et al.* Critical loss of the balance between Th17 and T regulatory cell populations in pathogenic SIV infection. *PLoS Pathogens* (2009). doi:10.1371/journal.ppat.1000295
33. Sandler, N. G. & Douek, D. C. Microbial translocation in HIV infection: causes, consequences and treatment opportunities. *Nature reviews. Microbiology* **10**, 655–66 (2012).
34. Hayes, T. L. *et al.* Impact of highly active antiretroviral therapy initiation on CD4(+) T-cell repopulation in duodenal and rectal mucosa. *AIDS (London, England)* **27**, 867–77 (2013).
35. Buzón, M. J. *et al.* Deep molecular characterization of HIV-1 dynamics under suppressive HAART. *PLoS pathogens* **7**, e1002314 (2011).
36. Zhang, Q. Y. *et al.* Characterization of human small intestinal cytochromes P-450. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* **27**, 804–9 (1999).
37. Levy, J. A. *HIV and the pathogenesis of AIDS*.

38. Van Nierop, K. & De Groot, C. Human follicular dendritic cells: function, origin and development. *seminars in IMMUNOLOGY* **14**, 251–257 (2002).
39. Fukazawa, Y. *et al.* B cell follicle sanctuary permits persistent productive simian immunodeficiency virus infection in elite controllers. *Nature medicine* **21**, 132–139 (2015).
40. Pallikkuth, S. *et al.* Peripheral T Follicular Helper Cells Are the Major HIV Reservoir within Central Memory CD4 T Cells in Peripheral Blood from Chronically HIV-Infected Individuals on Combination Antiretroviral. **90**, 2718–2728 (2016).
41. Ebert, L. M., Schaerli, P. & Moser, B. Chemokine-mediated control of T cell traffic in lymphoid and peripheral tissues. *Molecular Immunology* **42**, 799–809 (2005).
42. Mikhak, Z., Agace, W. W. & Luster, A. D. *Lymphocyte Trafficking to Mucosal Tissues*. *Mucosal Immunology* (Elsevier, 2015). doi:10.1016/B978-0-12-415847-4.00040-9
43. Miles, B. & Connick, E. TFH in HIV Latency and as Sources of Replication-Competent Virus. *Trends in Microbiology* **24**, 338–344 (2016).
44. Miles, B. *et al.* Follicular regulatory T cells impair follicular T helper cells in HIV and SIV infection. *Nature Communications* **6**, 8608 (2015).
45. Atluri, V. S. R. *et al.* Effect of human immunodeficiency virus on blood-brain barrier integrity and function: an update. *Frontiers in cellular neuroscience* **9**, 212 (2015).
46. Hong, S. & Banks, W. A. Role of the immune system in HIV-associated neuroinflammation and neurocognitive implications. *Brain, Behavior, and Immunity* **45**, 1–12 (2015).
47. Ellis, R. J. *et al.* Cerebrospinal fluid human immunodeficiency virus type 1 RNA levels are elevated in neurocognitively impaired individuals with acquired immunodeficiency syndrome. *Annals of Neurology* **42**, 679–688 (1997).
48. Letendre, S. *et al.* Validation of the CNS Penetration-Effectiveness rank for quantifying antiretroviral penetration into the central nervous system. *Archives of neurology* **65**, 65–70 (2008).
49. Kim, R. B. *et al.* The drug transporter P-glycoprotein limits oral absorption and brain entry of HIV-1 protease inhibitors. *Journal of Clinical Investigation* **101**, 289–294 (1998).
50. Hayashi, K. *et al.* HIV-TAT protein upregulates expression of multidrug resistance protein 1 in the blood–brain barrier. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* **26**, 1052–1065

(2006).

51. Peluso, R., Haase, A., Stowring, L., Edwards, M. & Ventura, P. A Trojan Horse mechanism for the spread of visna virus in monocytes. *Virology* **147**, 231–6 (1985).
52. Yadav, A. & Collman, R. G. CNS inflammation and macrophage/microglial biology associated with HIV-1 infection. *Journal of Neuroimmune Pharmacology* **4**, 430–447 (2009).
53. Walsh, J. G. *et al.* Rapid inflammasome activation in microglia contributes to brain disease in HIV/AIDS. *Retrovirology* **11**, 35 (2014).
54. Hong, S. & Banks, W. A. Role of the immune system in HIV-associated neuroinflammation and neurocognitive implications. *Brain, Behavior, and Immunity* (2015). doi:10.1016/j.bbi.2014.10.008
55. Eugenin, E. A. & Berman, J. W. Gap Junctions Mediate Human Immunodeficiency Virus-Bystander Killing in Astrocytes. *Journal of Neuroscience* **27**, 12844–12850 (2007).
56. Anthony, I. C. & Bell, P. J. E. The Neuropathology of HIV/AIDS. *International Review of Psychiatry* **20**, 15–24 (2008).
57. Ances, B. M. & Ellis, R. J. Dementia and neurocognitive disorders due to HIV-1 infection. *Seminars in neurology* **27**, 86–92 (2007).
58. Iwasaki, A. Antiviral immune responses in the genital tract: clues for vaccines. *Nature reviews. Immunology* **10**, 699–711 (2010).
59. Launay, O. *et al.* Residual HIV-1 RNA and HIV-1 DNA production in the genital tract reservoir of women treated with HAART: The prospective ANRS EP24 GYNODYN study. *Antiviral Therapy* **16**, 843–852 (2011).
60. Gianella, S., Tsibris, A., Barr, L. & Godfrey, C. Barriers to a cure for HIV in women. *Journal of the International AIDS Society* **19**, 1–10 (2016).
61. Lee, S. K., Kim, C. J., Kim, D.-J. & Kang, J.-H. Immune cells in the female reproductive tract. *Immune Network* **15**, 16–26 (2015).
62. Bardeguet, A. D. *et al.* Lymphocyte shedding from genital tract of human immunodeficiency virus-infected women: immunophenotypic and clinical correlates. *American journal of obstetrics and gynecology* **176**, 158–65 (1997).

63. Pillai, S. K. *et al.* Semen-specific genetic characteristics of human immunodeficiency virus type 1 env. *Journal of virology* **79**, 1734–42 (2005).
64. Le Tortorec, A. & Dejucq-Rainsford, N. HIV infection of the male genital tract - Consequences for sexual transmission and reproduction. *International Journal of Andrology* **33**, (2010).
65. Halfon, P. *et al.* Semen may harbor hiv despite effective haart: Another piece in the puzzle. *PLoS ONE* **5**, 4–7 (2010).
66. Le Tortorec, A. *et al.* Infection of semen-producing organs by SIV during the acute and chronic stages of the disease. *PloS one* **3**, e1792 (2008).
67. Anderson, D. J. *et al.* White blood cells and HIV-1 in semen from vasectomised seropositive men. *Lancet (London, England)* **338**, 573–4 (1991).
68. Miller, C. J. *et al.* Pathology and localization of simian immunodeficiency virus in the reproductive tract of chronically infected male rhesus macaques. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* **70**, 255–62 (1994).
69. Le Tortorec, A. *et al.* Human prostate supports more efficient replication of HIV-1 R5 than X4 strains ex vivo. *Retrovirology* **5**, 119 (2008).
70. Else, L. J., Taylor, S., Back, D. J. & Khoo, S. H. Pharmacokinetics of antiretroviral drugs in anatomical sanctuary sites: The male and female genital tract. *Antiviral Therapy* **16**, 1149–1167 (2011).
71. Koethe, J. R., Hulgán, T. & Niswender, K. Adipose tissue and immune function: a review of evidence relevant to HIV infection. *The Journal of infectious diseases* **208**, 1194–201 (2013).
72. Dupin, N. *et al.* HIV and antiretroviral drug distribution in plasma and fat tissue of HIV-infected patients with lipodystrophy. *AIDS (London, England)* **16**, 2419–24 (2002).
73. Vernochet, C. *et al.* Human immunodeficiency virus protease inhibitors accumulate into cultured human adipocytes and alter expression of adipocytokines. *The Journal of biological chemistry* **280**, 2238–43 (2005).
74. Jorajuria, S. *et al.* ATP binding cassette multidrug transporters limit the anti-HIV activity of zidovudine and indinavir in infected human macrophages. *Antiviral Therapy* **9**, 519–528 (2004).

75. Swan, Z. D., Wonderlich, E. R. & Barratt-Boyes, S. M. Macrophage accumulation in gut mucosa differentiates AIDS from chronic SIV infection in rhesus macaques. *European Journal of Immunology* 446–454 (2015). doi:10.1002/eji.201545738
76. Deeks, S. G., Tracy, R. & Douek, D. C. Systemic Effects of Inflammation on Health during Chronic HIV Infection. *Immunity* **39**, 633–645 (2013).
77. Freiberg, M. S. *et al.* HIV infection and the risk of acute myocardial infarction. *JAMA internal medicine* **173**, 614–22 (2013).
78. French, M. A., King, M. S., Tschampa, J. M., da Silva, B. A. & Landay, A. L. Serum immune activation markers are persistently increased in patients with HIV infection after 6 years of antiretroviral therapy despite suppression of viral replication and reconstitution of CD4+ T cells. *The Journal of infectious diseases* **200**, 1212–5 (2009).
79. Neuhaus, J. *et al.* Markers of inflammation, coagulation, and renal function are elevated in adults with HIV infection. *The Journal of infectious diseases* **201**, 1788–95 (2010).
80. Younas, M., Psomas, C., Reynes, J. & Corbeau, P. Immune activation in the course of HIV-1 infection: Causes, phenotypes and persistence under therapy. *HIV Medicine* 1–17 (2015). doi:10.1111/hiv.12310
81. Marchetti, G., Tincati, C. & Silvestri, G. Microbial translocation in the pathogenesis of HIV infection and AIDS. *Clinical Microbiology Reviews* **26**, 2–18 (2013).
82. Zeitz, M. *et al.* HIV/SIV enteropathy. *Annals of the New York Academy of Sciences* **859**, 139–48 (1998).
83. Moir, S., Chun, T.-W. & Fauci, A. S. Pathogenic mechanisms of HIV disease. *Annual review of pathology* **6**, 223–48 (2011).
84. Favre, D. *et al.* Critical loss of the balance between Th17 and T regulatory cell populations in pathogenic SIV infection. *PLoS Pathogens* **5**, (2009).
85. Brenchley, J. M. *et al.* Microbial translocation is a cause of systemic immune activation in chronic HIV infection. **12**, 1365–1371 (2006).
86. Bettelli, E., Korn, T., Oukka, M. & Kuchroo, V. K. Induction and effector functions of T(H)17 cells. *Nature* **453**, 1051–7 (2008).
87. Chege, D. *et al.* Sigmoid Th17 populations, the HIV latent reservoir, and microbial translocation in men on long-term antiretroviral therapy. *AIDS (London, England)* **25**, 741–

9 (2011).

88. Jirillo, E. *et al.* The role of the liver in the response to LPS: experimental and clinical findings. *Journal of endotoxin research* **8**, 319–27 (2002).
89. Sandler, N. G. *et al.* Host response to translocated microbial products predicts outcomes of patients with HBV or HCV infection. *Gastroenterology* **141**, 1220–30, 1230–3 (2011).
90. Cesari, M. *et al.* Noncirrhotic portal hypertension in HIV-infected patients: a case control evaluation and review of the literature. *AIDS patient care and STDs* **24**, 697–703 (2010).
91. Dutertre, C. A. *et al.* Pivotal role of M-DC8(+) monocytes from viremic HIV-infected patients in TNFalpha overproduction in response to microbial products. *Blood* **120**, 2259–2268 (2012).
92. Kuller, L. H. *et al.* Inflammatory and coagulation biomarkers and mortality in patients with HIV infection. *PLoS medicine* **5**, e203 (2008).
93. Kelesidis, T., Kendall, M. A., Yang, O. O., Hodis, H. N. & Currier, J. S. Biomarkers of microbial translocation and macrophage activation: association with progression of subclinical atherosclerosis in HIV-1 infection. *The Journal of infectious diseases* **206**, 1558–67 (2012).
94. Anderson, K. V. Toll signaling pathways in the innate immune response. *Current opinion in immunology* **12**, 13–9 (2000).
95. Casulli, S. & Elbim, C. Interactions between human immunodeficiency virus type 1 and polymorphonuclear neutrophils. *Journal of Innate Immunity* **6**, 13–20 (2014).
96. Michailidis, C. *et al.* Impaired phagocytosis among patients infected by the human immunodeficiency virus: Implication for a role of highly active anti-retroviral therapy. *Clinical and Experimental Immunology* **167**, 499–504 (2012).
97. Pitrak, D. L., Bak, P. M., DeMarais, P., Novak, R. M. & Andersen, B. R. Depressed neutrophil superoxide production in human immunodeficiency virus infection. *J Infect Dis* **167**, 1406–1410 (1993).
98. Elbim, C. *et al.* Polymorphonuclear neutrophils from human immunodeficiency virus-infected patients show enhanced activation, diminished fMLP-induced L-selectin shedding, and an impaired oxidative burst after cytokine priming. *Blood* **84**, 2759–66 (1994).

99. Ho, J. L. *et al.* Neutrophils from human immunodeficiency virus (HIV)-seronegative donors induce HIV replication from HIV-infected patients' mononuclear cells and cell lines: an in vitro model of HIV transmission facilitated by *Chlamydia trachomatis*. *The Journal of experimental medicine* **181**, 1493–505 (1995).
100. Chang, T. L., Vargas, J., DelPortillo, A. & Klotman, M. E. Dual role of alpha-defensin-1 in anti-HIV-1 innate immunity. *The Journal of clinical investigation* **115**, 765–73 (2005).
101. Guo, C.-J., Tan, N., Song, L., Douglas, S. D. & Ho, W.-Z. Alpha-defensins inhibit HIV infection of macrophages through upregulation of CC-chemokines. *AIDS (London, England)* **18**, 1217–8 (2004).
102. D'Agostino, C. *et al.* In vivo release of alpha-defensins in plasma, neutrophils and CD8 T-lymphocytes of patients with HIV infection. *Current HIV research* **7**, 650–5 (2009).
103. Kawai, T. & Akira, S. Toll-like receptor and RIG-I-like receptor signaling. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1143**, 1–20 (2008).
104. Saitoh, T. *et al.* Neutrophil extracellular traps mediate a host defense response to human immunodeficiency virus-1. *Cell host & microbe* **12**, 109–16 (2012).
105. Baldelli, F. *et al.* Programmed granulocyte neutrophil death in patients at different stages of HIV infection. *AIDS (London, England)* **14**, 1067–9 (2000).
106. Elbim, C. *et al.* Early divergence in neutrophil apoptosis between pathogenic and nonpathogenic simian immunodeficiency virus infections of nonhuman primates. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **181**, 8613–23 (2008).
107. Mastroianni, C. M. *et al.* Improvement in neutrophil and monocyte function during highly active antiretroviral treatment of HIV-1-infected patients. *AIDS (London, England)* **13**, 883–90 (1999).
108. Matsushita, S. *et al.* Spontaneous recovery of hemoglobin and neutrophil levels in Japanese patients on a long-term Combivir containing regimen. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology* **33**, 188–93 (2005).
109. Crowe, S., Mills, J. & McGrath, M. S. Quantitative immunocytofluorographic analysis of CD4 surface antigen expression and HIV infection of human peripheral blood monocyte/macrophages. *AIDS research and human retroviruses* **3**, 135–45 (1987).
110. Gendelman, H. E. *et al.* Efficient isolation and propagation of human immunodeficiency virus on recombinant colony-stimulating factor 1-treated monocytes. *The Journal of*

- experimental medicine* **167**, 1428–41 (1988).
111. Ziegler-Heitbrock, L. *et al.* Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *Blood* **116**, e74-80 (2010).
 112. Thieblemont, N., Weiss, L., Sadeghi, H. M., Estcourt, C. & Haeffner-Cavaillon, N. CD14^{low}CD16^{high}: a cytokine-producing monocyte subset which expands during human immunodeficiency virus infection. *European journal of immunology* **25**, 3418–24 (1995).
 113. Pulliam, L., Gascon, R., Stubblebine, M., McGuire, D. & McGrath, M. S. Unique monocyte subset in patients with AIDS dementia. *Lancet (London, England)* **349**, 692–5 (1997).
 114. Han, J. *et al.* CD14^(high)CD16⁽⁺⁾ rather than CD14^(low)CD16⁽⁺⁾ monocytes correlate with disease progression in chronic HIV-infected patients. *Journal of acquired immune deficiency syndromes (1999)* **52**, 553–9 (2009).
 115. Ziegler-Heitbrock, L. Blood monocytes and their subsets: Established features and open questions. *Frontiers in Immunology* **6**, 1–5 (2015).
 116. Ellery, P. J. *et al.* The CD16⁺ monocyte subset is more permissive to infection and preferentially harbors HIV-1 in vivo. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **178**, 6581–9 (2007).
 117. Allers, K. *et al.* Macrophages accumulate in the gut mucosa of untreated HIV-infected patients. *The Journal of infectious diseases* **209**, 739–48 (2014).
 118. Miller, C. S. *et al.* High prevalence of multiple human herpesviruses in saliva from human immunodeficiency virus-infected persons in the era of highly active antiretroviral therapy. *Journal of clinical microbiology* **44**, 2409–15 (2006).
 119. Gaudreault, E., Fiola, S., Olivier, M. & Gosselin, J. Epstein-Barr virus induces MCP-1 secretion by human monocytes via TLR2. *Journal of virology* **81**, 8016–24 (2007).
 120. Savard, M. *et al.* Infection of primary human monocytes by Epstein-Barr virus. *Journal of virology* **74**, 2612–9 (2000).
 121. West, J. & Damania, B. Upregulation of the TLR3 pathway by Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus during primary infection. *Journal of virology* **82**, 5440–9 (2008).
 122. Monini, P. *et al.* Reactivation and persistence of human herpesvirus-8 infection in B cells and monocytes by Th-1 cytokines increased in Kaposi's sarcoma. *Blood* **93**, 4044–58 (1999).

123. Ahmad, R., El Bassam, S., Cordeiro, P. & Menezes, J. Requirement of TLR2-mediated signaling for the induction of IL-15 gene expression in human monocytic cells by HSV-1. *Blood* **112**, 2360–8 (2008).
124. Young, M. R., Newby, M. & Wepsic, H. T. Hematopoiesis and suppressor bone marrow cells in mice bearing large metastatic Lewis lung carcinoma tumors. *Cancer research* **47**, 100–5 (1987).
125. Serafini, P. Myeloid derived suppressor cells in physiological and pathological conditions: The good, the bad, and the ugly. *Immunologic Research* **57**, 172–184 (2013).
126. Peranzoni, E. *et al.* Myeloid-derived suppressor cell heterogeneity and subset definition. *Current opinion in immunology* **22**, 238–44 (2010).
127. Vollbrecht, T. *et al.* Chronic progressive HIV-1 infection is associated with elevated levels of myeloid-derived suppressor cells. *Aids* **26**, F31–F37 (2012).
128. Goh, C., Narayanan, S. & Hahn, Y. S. Myeloid-derived suppressor cells: The dark knight or the joker in viral infections? *Immunological Reviews* **255**, 210–221 (2013).
129. Qin, A. *et al.* Expansion of monocytic myeloid-derived suppressor cells dampens T cell function in HIV-1-seropositive individuals. *Journal of virology* **87**, 1477–1490 (2013).
130. Abraham, S. N. & St John, A. L. Mast cell-orchestrated immunity to pathogens. *Nature reviews. Immunology* **10**, 440–452 (2010).
131. Galli, S. J., Nakae, S. & Tsai, M. Mast cells in the development of adaptive immune responses. *Nature immunology* **6**, 135–142 (2005).
132. Carroll-Portillo, A., Surviladze, Z., Cambi, A., Lidke, D. S. & Wilson, B. S. Mast cell synapses and exosomes: membrane contacts for information exchange. *Frontiers in immunology* **3**, 46 (2012).
133. Valitutti, S. & Espinosa, E. Cognate interactions between mast cells and helper T lymphocytes. *Self/nonself* **1**, 114–122 (2010).
134. Guimarães, J. V. *et al.* Quantification of mast cells in the uterine cervix of women infected with human immunodeficiency virus. *Annals of diagnostic pathology* **15**, 318–22 (2011).
135. Bishop, P. E., McMillan, A. & Gilmour, H. M. Immunological study of the rectal mucosa of men with and without human immunodeficiency virus infection. *Gut* **28**, 1619–24 (1987).

136. Cells, C. D. T. Human Mucosal Mast Cells Capture HIV-1 and Mediate Viral. **90**, 2928–2937 (2016).
137. Altfeld, M., Fadda, L., Frleta, D. & Bhardwaj, N. DCs and NK cells: critical effectors in the immune response to HIV-1. *Nature reviews. Immunology* **11**, 176–86 (2011).
138. Lanzavecchia, A. & Sallusto, F. Regulation of T cell immunity by dendritic cells. *Cell* **106**, 263–6 (2001).
139. Ferlazzo, G. *et al.* Distinct roles of IL-12 and IL-15 in human natural killer cell activation by dendritic cells from secondary lymphoid organs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 16606–11 (2004).
140. Romagnani, C. *et al.* Activation of human NK cells by plasmacytoid dendritic cells and its modulation by CD4+ T helper cells and CD4+ CD25hi T regulatory cells. *European journal of immunology* **35**, 2452–8 (2005).
141. Wu, L. & KewalRamani, V. N. Dendritic-cell interactions with HIV: infection and viral dissemination. *Nature reviews. Immunology* **6**, 859–68 (2006).
142. Agosto, L. M., Uchil, P. D. & Mothes, W. HIV cell-to-cell transmission: effects on pathogenesis and antiretroviral therapy. *Trends in microbiology* **23**, 289–95 (2015).
143. Schmidt, B., Ashlock, B. M., Foster, H., Fujimura, S. H. & Levy, J. A. HIV-infected cells are major inducers of plasmacytoid dendritic cell interferon production, maturation, and migration. *Virology* **343**, 256–66 (2005).
144. Beignon, A.-S. *et al.* Endocytosis of HIV-1 activates plasmacytoid dendritic cells via Toll-like receptor-viral RNA interactions. *The Journal of clinical investigation* **115**, 3265–75 (2005).
145. Donaghy, H. *et al.* Loss of blood CD11c(+) myeloid and CD11c(-) plasmacytoid dendritic cells in patients with HIV-1 infection correlates with HIV-1 RNA virus load. *Blood* **98**, 2574–6 (2001).
146. Sabado, R. L. *et al.* Evidence of dysregulation of dendritic cells in primary HIV infection. *Blood* **116**, 3839–52 (2010).
147. Malleret, B. *et al.* Primary infection with simian immunodeficiency virus: plasmacytoid dendritic cell homing to lymph nodes, type I interferon, and immune suppression. *Blood* **112**, 4598–608 (2008).

148. Killian, M. S., Fujimura, S. H., Hecht, F. M. & Levy, J. A. Similar changes in plasmacytoid dendritic cell and CD4 T-cell counts during primary HIV-1 infection and treatment. *AIDS (London, England)* **20**, 1247–52 (2006).
149. Benlahrech, A., Gotch, F., Kelleher, P. & Patterson, S. Loss of NK stimulatory capacity by plasmacytoid and monocyte-derived DC but not myeloid DC in HIV-1 infected patients. *PLoS ONE* **6**, (2011).
150. Donaghy, H., Gazzard, B., Gotch, F. & Patterson, S. Dysfunction and infection of freshly isolated blood myeloid and plasmacytoid dendritic cells in patients infected with HIV-1. *Reactions* **101**, 4505–4511 (2003).
151. Lehmann, C. *et al.* Plasmacytoid Dendritic Cells Accumulate and Secrete Interferon Alpha in Lymph Nodes of HIV-1 Patients. *PLoS ONE* **5**, e111110 (2010).
152. Manches, O. *et al.* HIV-activated human plasmacytoid DCs induce Tregs through an indoleamine 2,3-dioxygenase-dependent mechanism. *Journal of Clinical Investigation* **118**, 3431–3439 (2008).
153. Saez-Cirion, A. *et al.* Post-Treatment HIV-1 Controllers with a Long-Term Virological Remission after the Interruption of Early Initiated Antiretroviral Therapy ANRS VISCONTI Study. *PLoS Pathogens* **9**, (2013).
154. Th??ze, J., Chakrabarti, L. A., Vingert, B., Porichis, F. & Kaufmann, D. E. HIV controllers: A multifactorial phenotype of spontaneous viral suppression. *Clinical Immunology* **141**, 15–30 (2011).
155. International HIV Controllers Study *et al.* The major genetic determinants of HIV-1 control affect HLA class I peptide presentation. *Science (New York, N.Y.)* **330**, 1551–7 (2010).
156. Kosmrlj, A. *et al.* Effects of thymic selection of the T-cell repertoire on HLA class I-associated control of HIV infection. *Nature* **465**, 350–4 (2010).
157. López-Vázquez, A. *et al.* Interaction between KIR3DL1 and HLA-B*57 supertype alleles influences the progression of HIV-1 infection in a Zambian population. *Human immunology* **66**, 285–9 (2005).
158. 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. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **68**, 1169–1178 (2013).
159. Mannioui, A. *et al.* Dynamics of viral replication in blood and lymphoid tissues during SIVmac251 infection of macaques. *Retrovirology* **6**, 106 (2009).

160. Sellier, P. *et al.* Antiretroviral treatment start-time during primary SIVmac infection in macaques exerts a different impact on early viral replication and dissemination. *PLoS ONE* **5**, (2010).
161. Vishnu, P. & Aboulaflia, D. M. Haematological manifestations of human immune deficiency virus infection. *British Journal of Haematology* 695–709 (2015). doi:10.1111/bjh.13783
162. Thiebot, H. *et al.* Impact of bone marrow hematopoiesis failure on T-cell generation during pathogenic simian immunodeficiency virus infection in macaques Impact of bone marrow hematopoiesis failure on T-cell generation during pathogenic simian immunodeficiency virus infecti. **105**, 2403–2409 (2012).
163. Bendall, S. C., Nolan, G. P., Roederer, M. & Chattopadhyay, P. K. A deep profiler's guide to cytometry. *Trends in Immunology* **33**, 323–332 (2012).
164. Qiu, P. *et al.* Extracting a cellular hierarchy from high-dimensional cytometry data with SPADE. *Nature Biotechnology* **29**, 886–891 (2011).
165. Egger, G., Burda, A. & Glasner, A. A simple method for measuring the F-actin content of human polymorphonuclear leukocytes in whole blood. *Virchows Archiv : an international journal of pathology* **438**, 394–7 (2001).
166. Wilder, M. E. & Cram, L. S. Differential fluorochromasia of human lymphocytes as measured by flow cytometry. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* **25**, 888–91 (1977).
167. Köhler, G. & Milstein, C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* **256**, 495–7 (1975).
168. Mahnke, Y., Chattopadhyay, P. & Roederer, M. Publication of optimized multicolor immunofluorescence panels. *Cytometry. Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology* **77**, 814–8 (2010).
169. Thomas, R. *Practical guide to ICP-MS : a tutorial for beginners.*
170. Ornatsky, O. *et al.* Highly multiparametric analysis by mass cytometry. *Journal of Immunological Methods* **361**, 1–20 (2010).
171. Bandura, D. R. *et al.* Mass cytometry: technique for real time single cell multitarget immunoassay based on inductively coupled plasma time-of-flight mass spectrometry. *Analytical chemistry* **81**, 6813–22 (2009).

172. Finck, R. *et al.* Normalization of mass cytometry data with bead standards. *Cytometry Part A* **83 A**, 483–494 (2013).
173. Rogers, J. & Gibbs, R. a. Comparative primate genomics: emerging patterns of genome content and dynamics. *Nature reviews. Genetics* **15**, 347–59 (2014).
174. Hatzioannou, T. & Evans, D. T. Animal models for HIV/AIDS research. *Nature Reviews Microbiology* **10**, 852–867 (2012).
175. Mee, E. T. *et al.* Mhc haplotype H6 is associated with sustained control of SIVmac251 infection in Mauritian cynomolgus macaques. *Immunogenetics* **61**, 327–339 (2009).
176. Stevens, A. & Lowe, J. *Histologie humaine*. (De Boeck Université, 1997).
177. Bolliger, A. P. & Fontaine, M. COMPARATIVE HAEMATOLOGY Original Article Cytological Examination and Cellular Composition of Bone Marrow in Healthy , Adult , Cynomolgus Monkeys (*Macaca fascicularis*). 183–190 (1998).
178. Gorczyca, W. *et al.* *Immunophenotypic Pattern of Myeloid Populations by Flow Cytometry Analysis. Methods in Cell Biology* **103**, (Elsevier Inc., 2011).
179. Sugimoto, C. *et al.* Differentiation Kinetics of Blood Monocytes and Dendritic Cells in Macaques: Insights to Understanding Human Myeloid Cell Development. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **195**, 1774–1781 (2015).
180. STRANFORD Sharon, PUNT Jenni, O. J. *Immunologie, Le cours de Janis Kuby (7° Éd.)*. (2014).
181. Nauseef, W. M. & Borregaard, N. Neutrophils at work. *Nature immunology* **15**, 602–11 (2014).
182. Hogarth, P. M. & Pietersz, G. a. Fc receptor-targeted therapies for the treatment of inflammation, cancer and beyond. *Nature Reviews Drug Discovery* **11**, 311–331 (2012).
183. Jaillon, S. *et al.* Neutrophils in innate and adaptive immunity. *Seminars in Immunopathology* **35**, 377–394 (2013).
184. de Oliveira, S., Rosowski, E. E. & Huttenlocher, A. Neutrophil migration in infection and wound repair: going forward in reverse. *Nature Reviews Immunology* **16**, 378–391 (2016).
185. Greenlee-Wacker, M. C. Clearance of apoptotic neutrophils and resolution of

- inflammation. *Immunological Reviews* **273**, 357–370 (2016).
186. Pritz, T., Weinberger, B. & Grubeck-Loebenstein, B. The aging bone marrow and its impact on immune responses in old age. *Immunology Letters* **162**, 310–315 (2014).
 187. Dutertre, C. A. *et al.* TLR3-responsive, XCR1+, CD141(BDCA-3)+/CD8alpha+-equivalent dendritic cells uncovered in healthy and simian immunodeficiency virus-infected rhesus macaques. *Journal of Immunology* **192**, 4697–4708 (2014).
 188. Hashizume, M., Higuchi, Y., Uchiyama, Y. & Mihara, M. IL-6 plays an essential role in neutrophilia under inflammation. *Cytokine* **54**, 92–99 (2011).
 189. Diggins, K. E., Brent Ferrell, P. & Irish, J. M. Methods for discovery and characterization of cell subsets in high dimensional mass cytometry data. *Methods* **82**, 55–63 (2015).

AGREMENT SCIENTIFIQUE

En vue de l'obtention du permis d'imprimer de la thèse de doctorat vétérinaire

Je soussignée, Séverine BOULLIER, Enseignant-chercheur, de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, directeur de thèse, certifie avoir examiné la thèse de **Julien LEMAITRE** intitulée « **Rôle des cellules myéloïdes dans la persistance virale au cours de l'infection par le VIH : Caractérisation de la moelle osseuse et du sang périphérique du modèle macaque cynomolgus infecté par le virus SIV mac251.**» et que cette dernière peut être imprimée en vue de sa soutenance.

Fait à Toulouse, le 23 novembre 2016
Docteur Séverine BOULLIER
Maître de Conférences
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse



Vu :
La Directrice de l'Ecole Nationale
Vétérinaire de Toulouse
Isabelle CHMITELIN



Vu :
Le Président du jury :
Professeur Christophe PASQUIER



Vu et autorisation de l'impression :
Président de l'Université
Paul Sabatier
Monsieur Jean-Pierre VINEL



M. Julien LEMAITRE
a été admis(e) sur concours en : 2011
a obtenu son diplôme d'études fondamentales vétérinaires le : 25/06/2015
a validé son année d'approfondissement le : 08/09/2016
n'a plus aucun stage, ni enseignement optionnel à valider.

Toulouse, 2016

NOM : LEMAITRE

PRENOM : JULIEN

TITRE : Rôle des cellules myéloïdes dans la persistance virale au cours de l'infection par le VIH : Caractérisation de la moelle osseuse et du sang périphérique du modèle macaque cynomolgus infecté par le virus SIVmac251.

RESUME : Les combinaisons d'antirétroviraux ont permis de réduire la mortalité et les morbidités associées au VIH mais ne permettent pas une éradication du virus. L'étude du réservoir viral et du système immunitaire dans des cohortes de patients est limitée par l'impossibilité de réaliser des prélèvements sanguins et tissulaires répétés. Un modèle primate non humain, comme le macaque cynomolgus infecté par le SIVmac251, est donc nécessaire pour comprendre la dynamique de l'infection par le VIH et son traitement. A l'aide d'une technologie de cytométrie de masse, nous avons décrit les populations myéloïdes de la moelle osseuse et du sang au repos, et au cours de l'infection chronique par le SIVmac251. L'infection par le SIVmac251 induit une forte mobilisation des neutrophiles immatures depuis la moelle osseuse vers la circulation sanguine, ainsi que la disparition des polynucléaires neutrophiles matures du sang, recrutés probablement vers des tissus comme l'intestin où l'inflammation est intense.

MOTS-CLES : VIH, SIV, cellules myéloïdes, polynucléaires neutrophiles, macaque cynomolgus, inflammation chronique, cytométrie de masse

TITLE: Myeloid cells and viral persistence in HIV infection and treatment: Characterization of bone marrow and peripheral blood in cynomolgus macaques infected by SIVmac251.

SUMMARY: Combinational antiretroviral therapy reduces HIV associated mortality and morbidity but do not eradicate virus. Study of viral reservoir and immune system from patient groups is limited by the inability to access several blood samples and biopsies. So non-human primate models, such as SIVmac251-infected cynomolgus macaques, are necessary to understand HIV infection and treatment dynamics. Using mass cytometry approach, we described myeloid cells from bone marrow and peripheral blood in non-infected animals and during chronic SIVmac251 infection. Infection by SIVmac251 induce a strong immature polymorphonuclear neutrophils mobilization from bone marrow to blood, whereas mature polymorphonuclear neutrophils disappear from blood, probably by recruitment in tissues, such as intestine, where inflammation is strong.

KEY WORDS: HIV, SIV, myeloid cells, polymorphonuclear neutrophils, cynomolgus macaques, chronic inflammation, mass cytometry