



Contribution du réservoir macrophagique intestinal sous traitement antirétroviral au cours de l'infection par le Virus de l'Immunodéficience Simienne

Mémoire

Julien Clain

Maîtrise en microbiologie-immunologie - avec mémoire
Maître ès sciences (M. Sc.)

Québec, Canada

© Julien Clain, 2019



**Contribution du réservoir macrophagique intestinal sous
traitement antirétroviral au cours de l'infection par le
Virus de l'Immunodéficience Simienne**

Mémoire

Julien Clain

Maîtrise en microbiologie-immunologie

Maître ès sciences (M.Sc.)

Québec, Canada

Sous la direction de :

Jérôme Estaquier

© Julien CLAIN, 2019

Résumé

Les cellules monocytaires et les macrophages sont des cibles du virus de l'immunodéficience humaine (VIH-1) et du virus de l'immunodéficience simienne (VIS). D'une part, il a été proposé que les monocytes sanguins sont essentiels dans la réponse immune intestinale. D'autre part, les cellules monocytaires circulants reconstituent et repeuplent la région intestinale, qui est la première cible du VIH-1 et du VIS. Par conséquent, les cellules monocytaires intestinales pourraient contribuer à la dissémination virale dans l'organisme mais aussi représenter un réservoir viral sous thérapie antirétrovirale (TAR).

Dans ce contexte, nous avons abordé la contribution des monocytes intestinaux dans le maintien des réservoirs viraux (VRs) chez le macaque rhésus (MR) infecté par la souche SIVmac251.

Nos résultats montrent que la TAR précoce contrôle efficacement l'infection virale des cellules monocytaires, aussi bien dans le sang que dans l'intestin. Parallèlement au rebond viral après l'interruption du traitement, nous avons observé l'infection précoce des monocytes, qui présentent non seulement de l'ADN viral, mais également de l'ARN viral. Ces résultats indiquent que les sous-ensembles de cellules monocytes ne peuvent pas être considérés comme des VRs majeurs sous TAR, mais peuvent contribuer à la production virale et à la dissémination du virus une fois que celui-ci est interrompu.

Abstract

Monocytic cells and macrophages are targets of human immunodeficiency virus (HIV-1) and simian immunodeficiency virus (SIV). On the one hand, it has been proposed that blood monocytes are essential in the intestinal immune response. On the other hand, circulating monocytic cells reconstitute and repopulate the intestinal tract, which is the primary target of HIV-1 and SIV. Therefore, intestinal monocytic cells could contribute to the viral dissemination but also represent a viral reservoir under antiretroviral therapy (ART).

In this context, we discussed the contribution of intestinal monocytes in the maintenance of viral reservoirs (VRs) in rhesus macaque (RM) infected with SIV_{mac251}.

Our results show that early ART effectively controls the viral infection of monocytic cells, both in the blood and in the intestine. Along with viral rebound after treatment interruption, we have observed early infection of monocytes, which not only display viral DNA, but also viral RNA. These results indicate that subsets of monocyte cells cannot be considered as major VRs under ART, but may contribute to viral production and viral dissemination once treatment is interrupted.

Table des matières

Résumé	ii
Abstract.....	iii
Table des matières	iv
Liste des tableaux	vi
Liste des figures.....	vii
Liste des abréviations	viii
Remerciements	x
Chapitre 1 : Introduction.....	1
1.1 État des lieux du Virus de l'Immunodéficience Humaine et du SIDA.....	1
1.1.1 Épidémiologie.....	1
1.1.2 Modes de transmission et Prévention	3
1.2 Transmission inter-espèces et SIDA.....	4
1.2.1 Primates Non-Humains : hôtes naturels et non-naturels du VIS	4
1.2.2 Origine du VIH : théorie de la zoonose.....	5
1.3 Caractéristiques du VIH-1 / VIS.....	6
1.3.1 Structure du virus	7
1.3.2 Cycle de vie du virus	9
1.3.3 Pathogénèse du virus	12
1.4 Stratégies thérapeutiques contre le VIH/VIS.....	14
1.5 Cellules cibles du VIH : sources de réservoirs	15
1.5.1 La lignée lymphoïde	15
1.5.3 La lignée myéloïde	17
Chapitre 2 : Hypothèses et objectifs	21
Chapitre 3 : Matériels et méthodes.....	22
3.1 Macaques rhésus et infection par le VIS	22
3.1.1 Animaux et inoculation virale	22
3.1.2 Statut éthique	22
3.1.3 Prélèvement et préparations d'échantillons.....	24
3.2 Tri cellulaire.....	25
3.3 Quantification d'ADN et d'ARN viral par RT-qPCR	26
3.3.1 Quantification de la charge virale plasmatique	26
3.3.2 Quantification d'ARN et d'ADN viral associés aux cellules.....	26
3.4 Analyse statistique	29

Chapitre 4 : Résultats	30
4.1 Dynamique et infection des monocytes au cours de l'infection naturelle par le VIS 30	
4.1.1 Charge virale plasmatique et dynamique leucocytaire au cours de l'infection naturelle par le VIS	30
4.1.2 Cibles du VIS au cours de son infection naturelle	32
4.2 Dynamique et infection des monocytes sous TAR	34
4.2.1 Impact de la thérapie précoce sur la dynamique monocyttaire.....	34
4.2.2 Infection des monocytes sous TAR.....	36
4.3 Dynamique et infection des monocytes Post-TAR (ATi).....	38
4.3.1 Dynamique des cellules myéloïdes après l'interruption de traitement antirétroviral	38
4.3.2 Cibles précoces à l'arrêt du traitement	40
4.3.3 Cibles préférentielles à l'arrêt du traitement	41
Chapitre 5 : Discussion	44
Chapitre 6 : Conclusion et perspectives	49
Bibliographie	50

Liste des tableaux

Tableau 1. Classes d'antirétroviraux.	15
Tableau 2. Macaques rhésus infectés par le SIV.	24
Tableau 3. Anticorps utilisés.	25
Tableau 4. Amorces et sondes utilisées.	28

Liste des figures

Figure 1. Prévalence du VIH pour les adultes âgés de 15 à 49 ans.....	2
Figure 2. Susceptibilité des macaques à l'infection par le VIS	5
Figure 3. Transmission inter-espèces du virus du Sida et susceptibilité de l'hôte	5
Figure 4. Origine du VIH.	6
Figure 5. Schéma de la structure du VIH-1/VIS	7
Figure 6. Organisation génomique des lentivirus de primates	8
Figure 7. Représentation schématique du cycle de vie du VIH-1	11
Figure 8. Les étapes du cycle de vie du VIH-1 ciblées par les antirétroviraux	15
Figure 9. Schéma 1 du protocole expérimental	23
Figure 10. Principe de la méthode de séparation cellulaire par centrifugation en densité (Ficoll)	25
Figure 11. Schéma 2 du protocole expérimental.	29
Figure 12. Charge virale plasmatique et dynamique leucocytaire au cours de l'infection naturelle par le VIS.....	31
Figure 13. Dynamique de l'infection naturelle du VIS des cellules cibles.	33
Figure 14. Charge virale plasmatique et dynamique leucocytaire au cours d'une thérapie antirétrovirale.....	35
Figure 15. Dynamique de l'infection virale au cours du traitement antirétroviral (TAR) ...	37
Figure 16. Charge virale plasmatique et dynamique leucocytaire après l'interruption de TAR (ATi).	39
Figure 17. Dynamique de l'infection virale après l'interruption de TAR (ATi)	41
Figure 18. Cinétique de l'infection virale en fonction du temps après l'interruption de TAR (ATi)	43

Liste des abréviations

ADCC : Cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps
ADN : Acide désoxyribonucléique
ARN : Acide ribonucléique
ARNt : Acide ribonucléique de transfert
ART/TAR : Antiretroviral therapy / Thérapie antirétrovirale
ATi : Analytic Treatment Interruption
CCL : Chemokine ligand
CCR : Récepteur de chimiokines C-C
CD : Cluster de différenciation
ChemR23 : Récepteur de chémérine 23
CV : Charge Virale
CX3CL1 : chemokine [C-X3-C motif] ligand de type 1 / fractalkine
CX3CR1 : récepteur chemokine C-X3-C de type 1
DC : Cellule dendritique
DTG : Dolutégravir
dTTP : Désoxythymidine triphosphate
Fc γ RIII : Fc receptor for immune-complexed IgG (CD16)
FDA : Food and Drug Administration
FTC : Emtricitabine
GM-CSF : Facteur stimulant les colonies de granulocytes et de macrophages
gp : glycoprotéine
GPR : G protein-coupled receptor
HLA : Human leukocyte antigen
IDV : Indinavir
IFN : Interféron
IL : Interleukine
IN : Intégrase virale
INSTI : Inhibiteur d'intégrase
LEDGF/p75 : Lens Epithelium-derived Growth factor
LT : Lymphocyte T
LTR : Long terminal repeat
mDC : Cellule dendritique myéloïde
NC : Nucléocapside
Nef : Negative enhancer factor
NNRTI : Inhibiteurs non nucléosidiques de la transcriptase inverse
NRTI : Inhibiteurs nucléotidiques de la transcriptase inverse
ORF : Open reading frame
PBMC : Cellules mononuclées du sang périphérique

PI : inhibiteurs de protéase
PR : Protéase
Rev : Regulateur de l'expression virale
RGV : Raltégravir
RM : Rhesus macaques
RT : Reverse transcriptase
RT-qPCR : Quantitative reverse transcription PCR
RTV : Ritonavir
SIDA : Syndrome d'immunodéficience acquise
SP : Peptide signal
STLV-1 : simian T-cell leukemia virus type 1
Tat : Transactivator of transcription
Tcm : Lymphocyte T central mémoire
Tfh : T Follicular helper
TFV : Ténofovir
TGF β : Transforming growth factor beta
TNF : Tumor necrosis factor
Ttm : Lymphocyte T transitionnel mémoire
Vif : Viral infectivity factor
VIH : Virus de l'Immunodéficience Humaine
VIS : Virus de l'Immunodéficience Simienne
Vpr : Viral protein R
Vpu : Viral protein U
Vpx : Viral protein X

Remerciements

Mes remerciements s'adressent en premier lieu à mon directeur de recherche, Dr Jérôme Estaquier, pour ses conseils de qualité, sa disponibilité et son temps consacré à ma formation afin de mener à bien mon projet. Merci de m'avoir transmis cette passion et participer à mon enrichissement intellectuel.

J'exprime en outre toute ma reconnaissance aux membres de mon équipe, qui chaque jour, m'ont aidé dans mon parcours et qui par leurs conseils ont su me guider dans mes choix et mes réflexions tant scientifiques que personnelles. Je remercie Henintsoa qui m'a appris et fait part de ses méthodes judicieuses au laboratoire dès mon arrivée. Je remercie Gina et Ouafa, qui m'ont pris sous leurs ailes, pour leur gentillesse, leur patience et leur professionnalisme. Je remercie également Ghita, collègue de bureau et amie, qui me supporte tous les jours, surtout lors de ses longues journées et nuits passées au laboratoire.

Je tiens à adresser ma gratitude à mes amis de mon île natale, qui malgré la distance, continue à me soutenir et m'encourager dans mes projets. Je remercie particulièrement Lorelei, avec qui je partage peine et joie, qui me soutient et qui est présente pour m'accompagner dans ce parcours.

J'exprime à présent toute ma reconnaissance à ma famille, pour leur soutien inouï, qui me donne chaque jour, la force et le courage d'avancer et de continuer mes études, et ce malgré les milliers de kilomètres qui nous séparent. Je témoigne mon respect et ma gratitude à ma mère, mon père, Matthieu, Anne-Audrey, Ayana, Matthias, ma tendre Mamie et mon cher Papi pour leur support qui m'est inestimable.

Chapitre 1 : Introduction

1.1 État des connaissances sur l'infection à virus de l'immunodéficience humaine

1.1.1 Épidémiologie

Le syndrome d'immunodéficience acquise, plus communément appelé SIDA, est causé par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) [1]. Cette maladie est caractérisée par une forte susceptibilité à l'infection par des agents pathogènes opportunistes ou par l'apparition d'une forme agressive du sarcome de Kaposi ou d'un lymphome de type B [2]. Dans les années 1980, l'épidémie a été initialement associée aux hommes ayant des relations avec d'autres hommes, puis aux consommateurs de drogues et aux personnes recevant de la transfusion sanguine. Toutefois, cette pathologie désormais touche l'ensemble de la population, et ce à travers les 5 continents.

Aujourd'hui, les informations génomiques concernant le VIH permettent d'identifier sa diversité, son évolution, et aussi de confirmer son origine animale. En effet, il est admis que les deux souches du VIH (VIH-1 et VIH-2) proviennent d'une transmission inter-espèces du virus de l'immunodéficience simienne (VIS) [3]. Le VIH-1 comporte quatre groupes de virus distincts : M, N, O, P, et le VIH-2 en comporte deux : A et B [4]. La pandémie du SIDA est principalement causée par le VIH de type 1 du groupe M, qui est présent partout à travers la planète et majoritairement en Afrique (4,1%) [5] (Figure 1); tandis que le VIH de type 2 est plus confiné à l'ouest de l'Afrique, et se répand actuellement en Inde, avec une transmission plus limitée [2, 6]. Dans certains pays comme le Zimbabwe et le Botswana, plus de 25% des adultes sont infectés [2]. Selon les statistiques mondiales sur le VIH de l'ONUSIDA en 2017, 36,9 millions de personnes vivaient avec le virus, dont 21,7 millions avaient accès à la thérapie antirétrovirale, soit 59% des personnes séropositives. Cet accès au traitement est en augmentation chaque année. Environ 1,8 million de personnes ont été nouvellement infectées en 2017, sachant qu'il y a une baisse constante de cette estimation depuis le pic de 1996 (47% de réduction de nouvelles infections). Pour prévenir la transmission virale, les antirétroviraux sont plus accessibles aux femmes enceintes, soit 80%

des femmes enceintes vivants avec le VIH. Entre 670 000 et 1,3 million de personnes sont décédées suite aux maladies liées au SIDA en 2017, bien que les décès aient été réduits de plus de 51% depuis 2004. Il est estimé qu'environ 5 000 nouvelles infections se font quotidiennement, dont 66% concerne la population subsaharienne. En Amérique du Nord et en Europe occidentale et Centrale 13 000 décès liés au SIDA ont été rapportés en 2017, et 700 000 en Afrique. Le manque d'accès au traitement sur le continent Africain en est la principale cause [5]. Au Canada, on estime par ailleurs que 14% des personnes infectées vivent avec le VIH sans le savoir, et que malheureusement le nombre de nouvelles infections a légèrement augmenté en 2016 (2 165) comparativement à 2014 (1 960) [7]. Malgré l'accès au traitement par la population canadienne, le VIH reste tout de même un défi d'une grande ampleur pour le pays. Selon l'OMS, l'infection par le VIH est le principal facteur de risque de survenue d'une tuberculose évolutive. En 2015, 11% des personnes ayant développé la tuberculose étaient atteints du VIH, dont 75% dans la région africaine [8]. Ainsi, alors que la population africaine est la plus touchée par la pandémie, les traitements antirétroviraux sont inaccessibles pour la grande majorité de cette population exposée à l'infection [9].

Ainsi le SIDA porte à son paroxysme la pauvreté, en participant à l'augmentation des inégalités entre le monde développé et les pays en voie de développement. À ce jour, aucun traitement ne permet d'éradiquer le virus dans l'organisme. La prévention reste le meilleur moyen d'éviter la transmission du virus [8].

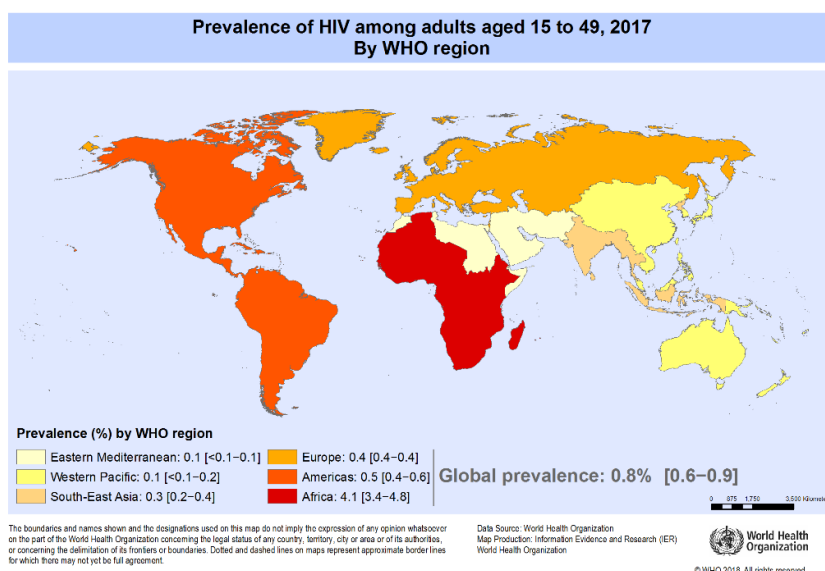


Figure 1. Prévalence du VIH pour les adultes âgés de 15 à 49 ans. OMS, 2017 [10]

1.1.2 Modes de transmission et Prévention

Le VIH se transmet par le biais de liquides biologiques. Trois conditions sont nécessaires pour pouvoir être infecté : une entrée (ex. une lésion), un transport (ex. du sperme) et une quantité suffisante de virus. Les liquides contenant du virus en concentration suffisante pour une infection sont : le sang, le sperme, le liquide pré-séminal chez l'homme, les sécrétions vaginales et le lait maternel. Ainsi, le VIH peut être transmis lors de rapports sexuels (anaux ou vaginaux) non protégés, par contact sang-sang et par voie périnatale de la mère au nouveau-né [11]. On estime que 30 à 45% des nourrissons acquièrent le VIH par transmission mère-enfant si aucune intervention n'est réalisée [12]. Le principal mode de transmission reste la relation sexuelle, représentant 90% des infections existantes dans le monde [7].

Pour la population la plus touchée par le VIH, les déterminants de la pandémie sont nombreux : changement de partenaires fréquents, âge médian au premier rapport sexuel bas, contact masculin avec les professionnels du sexe, faible utilisation du préservatif [13], manque d'hygiène [14], taux élevés de conditions de vies déplorables et mauvaises connaissances de la pandémie et des maladies infectieuses [15]. Cette liste non-exhaustive pourrait se compléter par d'autres déterminants socio-économiques, socioculturels, et épidémiologiques, mais ceux-là ne seront pas développer ici. La susceptibilité humaine à l'infection peut aussi être un facteur de transmission [16]. Les facteurs génétiques, la résistance innée, et la résistance acquise (très rare) sont impliqués dans la résistance à l'infection. Par exemple, une délétion du gène codant pour la molécule CCR5, un corécepteur pour le VIH, offre une protection conséquente contre l'infection du VIH-1 [17]. Aussi, les études ont montré que la circoncision masculine diminue considérablement une infection en éliminant un portail d'entrée contenant les cellules cibles du VIH [18].

Malgré tout, la prévention est le seul moyen d'éviter la contamination par le VIH. Concernant la transmission mère à enfant, la thérapie antirétrovirale est aujourd'hui la plus efficace pour prévenir l'infection au cours de l'accouchement ou de l'allaitement [19]. Concernant la transmission par contact sexuel, la prévention passe par plusieurs actions. On retrouve l'abstinence sexuelle, les débuts sexuels retardés, la réduction du nombre de partenaires, l'utilisation systématique du préservatif, l'utilisation de microbicides ou la prise

de prophylaxie pré- ou post-exposition. Pour les utilisateurs de drogues injectables, il s'agit de réduire le partage des aiguilles ou utiliser des aiguilles propres [16].

1.2 Transmission inter-espèces et SIDA

1.2.1 Primates non-humains : hôtes naturels et non-naturels du VIS

A ce jour, il a été répertorié que plus 40 espèces de primates non humains africains sont porteurs naturels d'un virus semblable au VIH, le Virus de l'immunodéficience simienne (VIS). On peut nommer le chimpanzé, le sooty mangabey, le singe vert d'Afrique, le mandrill ou encore le singe à queue de soleil. Contrairement aux humains infectés par le VIH, on considère généralement que ces « hôtes naturels » ne développent pas le SIDA malgré une infection chronique caractérisée par une réplication virale hautement active [20]. En effet, de récentes données suggèreraient que l'infection naturelle du chimpanzé pourrait s'avérer plus pathogénique que ce que l'on pensait [21]. En 1983, la découverte de la transmission du syndrome de l'immunodéficience acquise chez des macaques rhésus [22] a permis de montrer la susceptibilité inter-espèces des singes d'Asie au VIS, développant une maladie similaire au SIDA après infection [23]. Le macaque rhésus (*Macaca mulatta*), le cynomolgus (*Macaca fascicularis*) et le pigtail (*Macaca nemestrina*) font partis des hôtes non naturels, et sont communément utilisés en recherche biomédicale [24]. Il est à noter que la sensibilité au virus diffère selon les types de macaques (Figure 2 et 3). Par exemple, les macaques rhésus chinois sont moins sensibles que les macaques rhésus indiens, résultant en une évolution plus lente vers le SIDA, ce qui se rapproche du cas de l'homme [25].

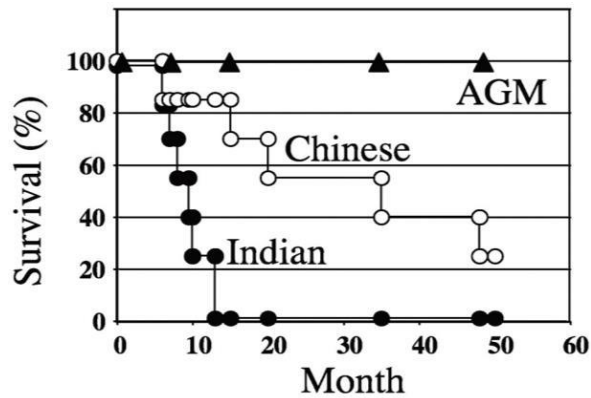


Figure 2. Susceptibilité des macaques à l'infection par le VIS. Cumont M.-C., 2008.



Figure 3. Transmission inter-espèces du virus du Sida et susceptibilité de l'hôte.
Jérôme Estaquier

1.2.2 Origine du VIH : théorie de la zoonose

Ayant connaissance de la capacité d'infection des singes d'Asie par le VIS des singes d'Afrique et du développement d'une maladie semblable au SIDA, la zoonose est la première théorie expliquant l'origine du VIH. Cette théorie est d'autant plus renforcée grâce aux analyses génétiques de 1990 qui suggèrent que le SIVcpz du chimpanzé serait à l'origine du VIH-1 [26] (Figure 4). Plus tard, il a été prouvé que les groupe M et N du VIH-1 auraient pour origine le VIScpz du chimpanzé et que le groupe O et P auraient pour origine le VISgor

du gorille. Le SIVsmm du Sooty mangabey a été premièrement proposé en 1989 comme étant à l'origine du VIH-2. Les études génétiques de *Gao et al.* en 1992 ont pu confirmer cette hypothèse. Le VISmac ressemblant au VIH-2, dériverait de ce dernier à cause d'une transmission par le virus hébergé par le Sooty mangabey [6].

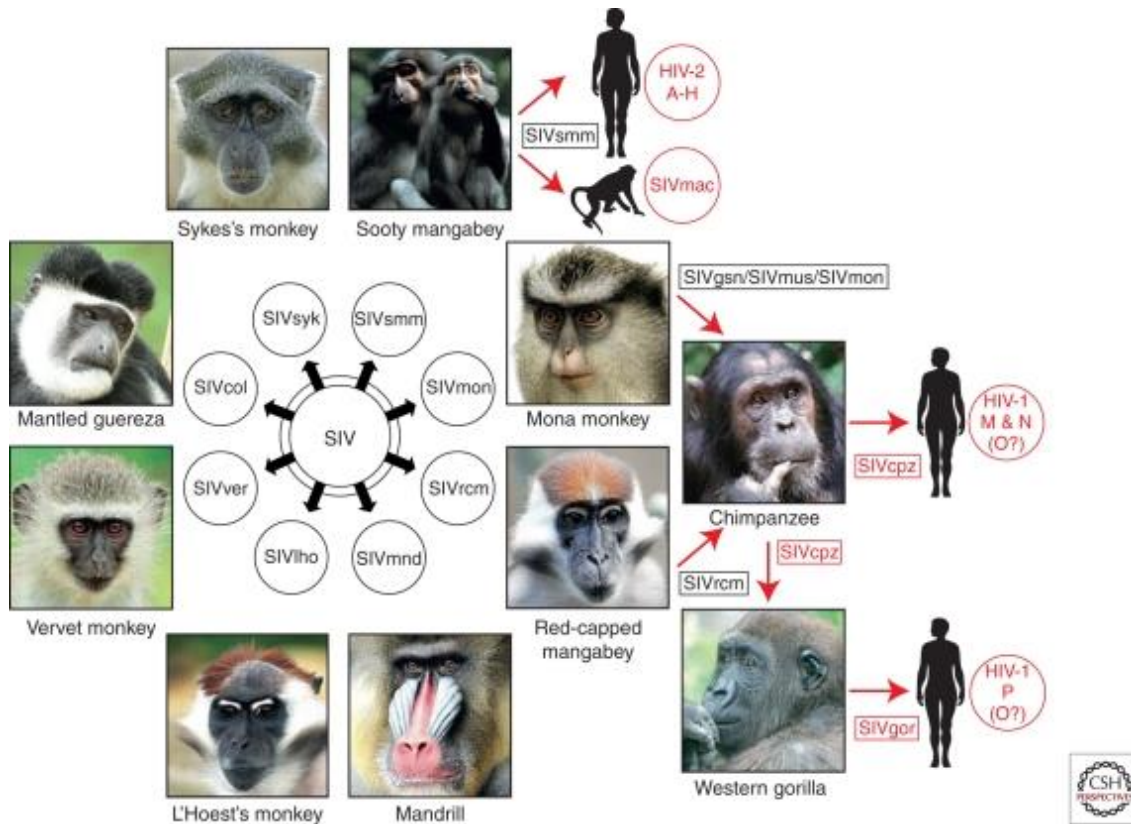


Figure 4. Origine du VIH. Sharp, P.M. et B.H. Hahn, 2011. [6]

1.3 Caractéristiques du VIH-1 / VIS

Le VIH-1/VIS appartient au genre des Lentivirus, du fait de sa longue et variable période d'incubation, de sa réplication virale persistante, de ses manifestations neurologiques et de la destruction de cellules hématologiques ou immunologiques spécifiques qu'il provoque [27]. Il fait partie de la famille des Rétroviridae, car sa réplication nécessite une transcriptase inverse (RT) lors de son entrée dans une cellule hôte [28].

1.3.1 Structure du virus

Une particule virale du VIH-1/VIS mature est de forme ronde, mesurant environ 100 nm de diamètre [28] (Figure 5). Elle possède une enveloppe composée d'une bicouche lipidique dérivée de la cellule hôte. Cette bicouche lipidique contient des glycoprotéines de surface, appelées gp120, qui sont ancrées au virus par des interactions avec la protéine transmembranaire gp41 [29]. Lors de l'étape du bourgeonnement virale, l'enveloppe du virus acquiert également des protéines membranaires telles que le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH), l'actine et l'ubiquitine [30]. La couche de la membrane interne du virus est formée par la protéine de la matrice p17 (MA). Elle recouvre la capsid de forme conique qui est assemblée par la protéine de capsid p24 (CA) [31]. A l'intérieur de la capsid se trouvent deux molécules identiques d'ARN génomique viral, ainsi que plusieurs enzymes virales telles que la transcriptase inverse (RT), l'RNase H et l'intégrase (IN). Le virus est aussi composé de protéines régulatrices Tat, Rev, Nef, Vif, Vpr et Vpu [28]. Tat active la transcription des gènes viraux ; Rev régule l'exportation d'ARNm viral non épissé et partiellement épissé ; Nef influence sur la réplication virale, augmente l'infectiosité des particules virales et régule négativement CD4 ; Vif est une protéine nécessaire à la production de virus infectieux ; Vpr est un composant de particules virales qui facilite l'infectiosité du virus et qui agit sur le cycle cellulaire ; Vpu contrôle la dégradation de CD4 et module le trafic intracellulaire [32].

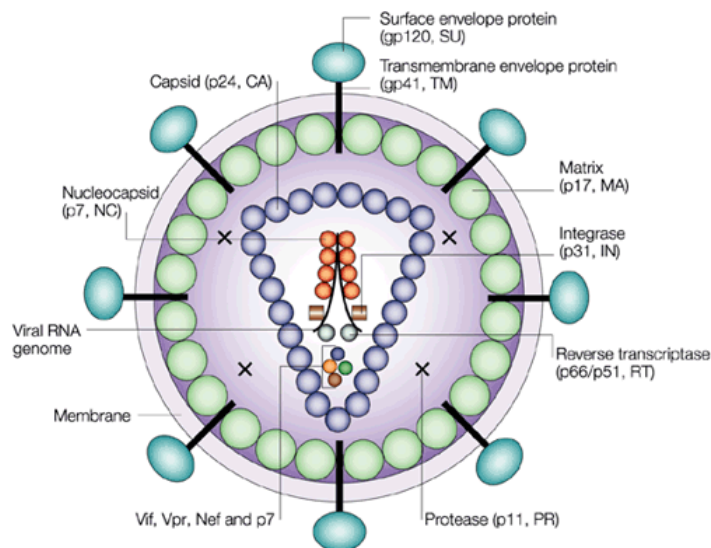


Figure 5. Schéma de la structure du VIH-1/VIS. Robinson HL, 2002. [33]

Le génome du VIH/VIS (Figure 6) est constitué de deux molécules d'ARN simple brin identiques, contenant 9 ORF (Open Reading Frame) qui produisent 15 protéines [34, 35]. Le génome viral est intégré au génome de la cellule hôte grâce au phénomène de la transcription inverse, de la dégradation de l'ARN et de l'intégration de l'ADN double brin dans le génome humain. A ce stade, le génome est appelé ADN proviral. Il est flanqué de chaque extrémité par des séquences LTR (Long Terminal Repeat). La région 5' LTR du gène code pour le promoteur responsable de la transcription qui se fait du sens 5' à 3' [28]. Le gène gag est premièrement transcrit, pour générer les protéines de la matrice (MA), de la capsid (CA), de la nucléocapsid (NC) et la protéine p6. Le gène pol code pour la protéase (PR), la transcriptase inverse (RT), l'intégrase (IN) et l'RNase H. Le gène Env code pour un peptide signal (SP) de 30 acides aminés, gp20 et gp41 [35]. Le génome code aussi pour les protéines régulatrices Tat et Rev pour initier la réplication, et les protéines Nef, Vif, Vpr et Vpu impliquées dans la réplication virale, le bourgeonnement viral et la pathogénèse. Le HIV-2 et le SIVmac codent en plus pour Vpx, une protéine auxiliaire capable d'inhiber le facteur de restriction SAMHD1, qui limite la réplication des lentivirus [36-38].

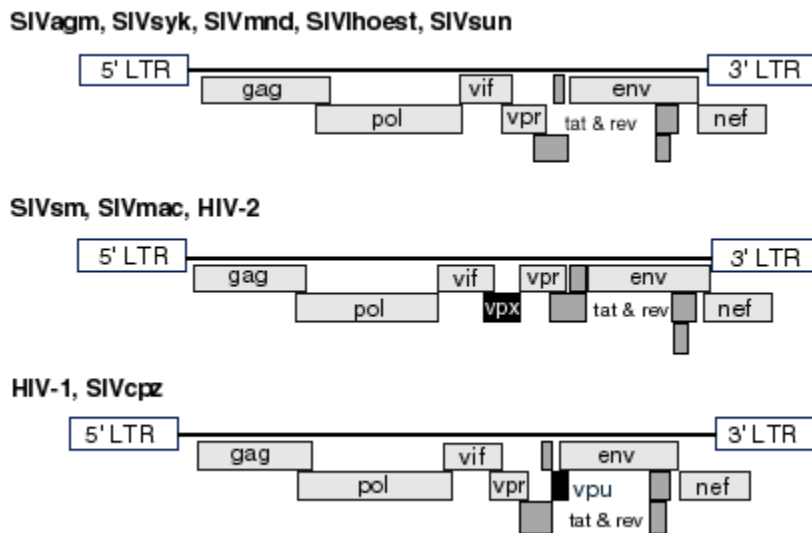


Figure 6. Organisation génomique des lentivirus de primates [39]

1.3.2 Cycle de vie du virus

Le virus nécessite la machinerie cellulaire d'une cellule hôte afin de se répliquer. Pour infecter une cellule, la principale cible du VIH/VIS est la glycoprotéine de surface CD4. Ainsi, le virus est capable d'infecter majoritairement les lymphocytes T CD4, mais aussi les monocytes, les macrophages ou encore les cellules dendritiques [40]. Dans ces cellules, le virus peut s'intégrer au génome et rester latent, ou peut se répliquer lors d'une activation cellulaire. Cependant, il est à noter qu'une infection peut se faire indépendamment des molécules CD4 notamment dans les astrocytes [41] et les cellules épithéliales rénales [42]. Deux phases sont observées durant le cycle de vie viral :

- une phase précoce où le virus s'attache à la cellule, rétrotranscrit son ARN en ADN et s'intègre au génome.

- une phase tardive où la transcription et la traduction du matériel génétique, l'assemblage de nouveaux virions, le bourgeonnement et la libération de ces virions sont réalisés.

Le virus s'attache à la cellule hôte grâce aux interactions entre les molécules CD4 et les protéines Env, complexes formés par gp120 et gp41. Cette liaison entraîne un changement de conformation dans Env permettant la liaison aux corécepteurs viraux. Les principaux corécepteurs sont CXCR4 (utilisé par le VIH-1) et CCR5 ou CD195 (utilisé par le VIH-1 et le VIS), déterminant le tropisme viral [43]. D'autres corécepteurs ont été cependant impliqués comme CCR1, CCR2b, CCR3, CCR4, CCR8, CCR9, CXCR2, CXCR5, CXCR6, CX3CR1, GPR1, GPR15, APJ, ChemR23 et RDC1 [44]. L'insertion de gp41 dans la membrane cellulaire initie ensuite la fusion membranaire [43].

La fusion de l'enveloppe virale avec la membrane de la cellule entraîne la libération de la capsid dans le cytoplasme de l'hôte. Après la décapsidation, le génome d'ARN subit une rétrotranscription catalysée par la transcriptase inverse (RT), pour convertir l'ARN en ADN double brins. Cette rétrotranscription se déroule en plusieurs étapes. Premièrement, elle est initiée par une amorce d'ARNt liée à la zone pbs (primer binding site) de l'ARN. Une synthèse d'ADN est réalisée du côté 5' de l'ARN générant un rétrotranscrit précoce, hybride ADN/ARN, appelé « minus-strand strong stop ». Ce fragment se transfère à la région 3' du génome provoquant la suite de la synthèse nucléique, un fragment plus long d'ADN. L'ARNt

lié au pbs est dégradé par l'RNase H et la synthèse d'ADN bicaténaire, linéaire, contenant des LTR à chaque extrémité aboutit [45].

Une fois l'ADN synthétisée, il se doit d'intégrer le génome de la cellule hôte en passant l'enveloppe nucléaire à l'aide d'un complexe de pré-intégration (PIC). C'est l'étape de l'import nucléaire. Ce complexe est composé entre autre de l'intégrase (IN), des protéines de la matrice (MA), de la nucléocapside (NC) et de Vpr [45]. D'autres facteurs peuvent influencer l'import nucléaire du virus : la kinésine KIF4B, la nucléoporine Nup358 [46], le fragment « ADN flap » généré durant la rétrotranscription [47] ou encore l'interaction importine alpha3 et IN [48].

L'insertion de l'ADN viral dans les domaines transcriptionnellement actifs de l'ADN chromosomique de l'hôte, est catalysée par l'enzyme intégrase et par d'autres enzymes de réparation [49]. D'ailleurs, cette intégration sélective favoriserait la réplication virulente du VIH. L'ADN intégré est nommé ADN proviral ou provirus [45]. Cette étape peut être favorisée par une protéine de la cellule hôte, LEDGF/p75 [50]. L'intégration se fait particulièrement au sein de cellules actives pouvant se convertir en cellules naïves, mais peut se faire également directement dans les cellules quiescentes [51]. Le cycle de réplication peut s'arrêter à cette étape dans les cellules quiescentes.

Après une activation cellulaire, le cycle de réplication peut reprendre son cours pour produire de nouvelles particules virales. Il s'agit des étapes tardives du cycle de réplication [52]. L'ADN proviral sert de matrice pour la synthèse des brins d'ARN. La protéine Tat initie la transcription en interagissant avec les séquences LTR de l'ARN viral. Une hyperphosphorylation de l'ARN polymérase II cellulaire provoque la production de trois classes d'ARN viraux. 1) Les ARN non épissés servent d'ARNm des précurseurs de polyprotéines Pr55^{Gag} et Pr160^{GagPol} et sont aussi conditionnés en ARN génomiques ; 2) Les ARNm partiellement épissés codent pour les protéines Env, Vif, Vpu/Vpx et Vpr ; 3) Les petits ARNm épissés sont traduits en Rev, Tat et Nef. Rev permet l'exportation d'ARN génomiques viraux et les ARNm partiellement épissés et non épissés du nucléoplasme vers le cytoplasme [53]. Le processus d'assemblage des protéines virales s'en suit, dont l'acteur majeur est le précurseur Pr55^{Gag}. Cette polyprotéine favorise les interactions Gag-Gag en ciblant la membrane plasmique, encapside le génome de l'ARN viral, s'associe aux glycoprotéines Env et stimule le bourgeonnement au niveau de la membrane plasmique. Les

protéines Env (gp120 et gp41) transportés à la surface cellulaire, sont générées par la glycoprotéine gp160 qui est clivée en passant par le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi [54]. Le bourgeonnement à la surface de la cellule est la dernière étape d'assemblage du virion. Cette étape est favorisée par des séquences spécifiques que code le rétrovirus, « late » ou « L » [55]. Pendant ou peu de temps après la libération du virus de la membrane plasmique, la protéase virale PR clive les polyprotéines précurseurs Gag et GagPol pour générer les protéines matures de Gag et Pol. Ainsi, les particules virales matures peuvent devenir infectieuses et infecter d'autres cellules environnantes, conduisant à un cycle continu de réplication virale [56].

Le cycle de vie du virus est schématisé par la figure suivante (Figure 7) :

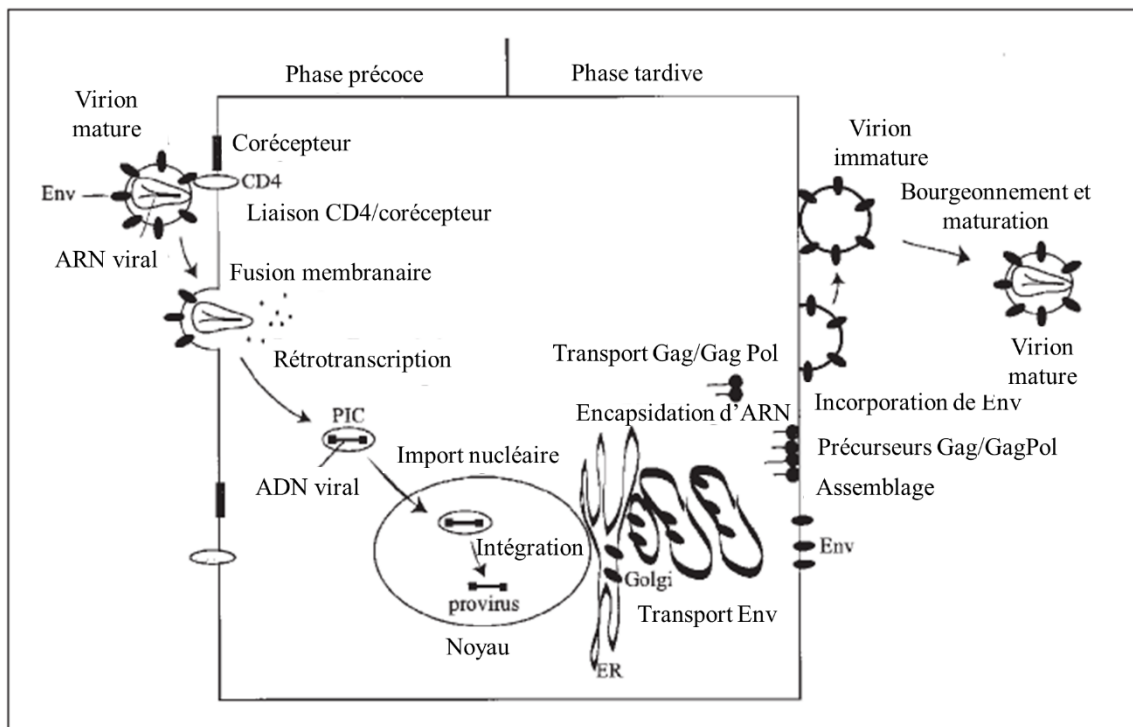


Figure 7. Représentation schématique du cycle de vie du VIH-1. Adapté de Abdul A. Waheed et Eric O. Freed, 2012. [57]

1.3.3 Pathogénèse du virus

La première phase d'infection par le VIH, nommé phase aigüe, est caractérisée par une haute virémie, par l'infection de différents organes et par un désordre immunologique important durant le premier mois [58, 59]. Les signes cliniques de cette primo-infection sont la fatigue, la fièvre, la myalgie, les maux de tête, les sueurs nocturnes, les pharyngites et les symptômes gastro-intestinaux [60].

Durant cette période, le virus est hautement répliatif dans le sang et dans le système lymphatique qui drainent les organes lymphoïdes, résultant en l'endommagement progressif du système immunitaire [61]. Dans le sang périphérique, il y a une corrélation entre la diminution du taux de lymphocytes T CD4 (LT CD4) activés et l'augmentation de la CV plasmatique. L'infection précoce des organes lymphoïdes (rate, moelle osseuse, ganglions) est observée dès les premiers jours d'infection. Il a également été montré que l'apoptose dans les organes lymphoïdes au cours de l'infection primaire prédit une progression rapide vers le SIDA [59]. Le cerveau représente également un sanctuaire viral qui est établi précocement après l'infection [62], souvent à l'origine de désordres neurocognitifs [63]. Cependant, le tractus gastro-intestinal est une cible préférentielle du VIH/VIS. Dans cette région, les lymphocytes T CD4 sont rapidement éliminés [64]. Au niveau de la lamina propria, il y a une perte particulière de Th17, qui produit des cytokines (IL-17, IL-22) importantes dans la régulation de l'intégrité mucoale et dans l'immunité antibactérienne [65]. Ce bouleversement immunologique entraîne une perméabilité de la lamina propria provoquant une translocation bactérienne. Ainsi, une sur-activation du système immunitaire se produit, facteur supplémentaire caractérisant l'infection par le VIH [66]. Cette sur-activation entraîne l'augmentation de cytokines pro-inflammatoires tels que TNF- α , IL-12, IL-15, ou IFN- γ qui favorisent la transcription du VIH [67]. Le TNF- α est notamment connu pour avoir un effet stimulateur sur le VIH-1 et par son effet activateur d'expression d'autres médiateurs de l'inflammation [68]. Lors de l'infection primaire, en dépit de l'activation des LT CD8, ces cellules effectrices ne peuvent éliminer les cellules infectées [69]. Elles sont aussi induites en apoptose à cause de la surexpression de TGF- β [70]. Parallèlement, la réponse des lymphocytes B, impliqués dans la production d'anticorps, est altérée et inefficace [71].

Pendant la phase chronique de l'infection, le niveau de virémie est d'un ou deux ordres de grandeur plus bas que le pic de virémie de la primo-infection. Les espèces virales se situant dans les différents compartiments de l'organisme se diversifient. Après avoir augmenté de niveau à la fin de la primo infection, le taux de LT CD4 diminue peu à peu [53] alors que le niveau de LT CD8 activés augmente [72]). Le niveau d'anticorps anti-VIH reste stable [53].

Durant toute la période d'infection, le système immunitaire s'épuise, ce qui mène au stade de l'immunodéficience, SIDA. Pendant cette phase, le taux de LT CD4 dans le sang diminue fortement, et la virémie plasmatique augmente considérablement. L'immunodéficience est confirmée lorsque le taux de LT CD4 est de moins de 200 par μL [73]. Les individus immunosupprimés sont exposés à de nombreuses infections opportunistes sans que le système immunitaire puisse agir [74]. Par conséquent, l'infection par le VIH est la cause majeure de la mort cellulaire programmée des LT CD4, par activation du récepteur FAS (communément appelé CD95), dans le sang périphérique et dans les tissus profonds [75]. Cette apoptose massive correspondrait soit à un système de défense de l'hôte pour permettre l'élimination de cellules infectées, soit à un système déjoué par le virus afin de déréguler le système immunitaire [76].

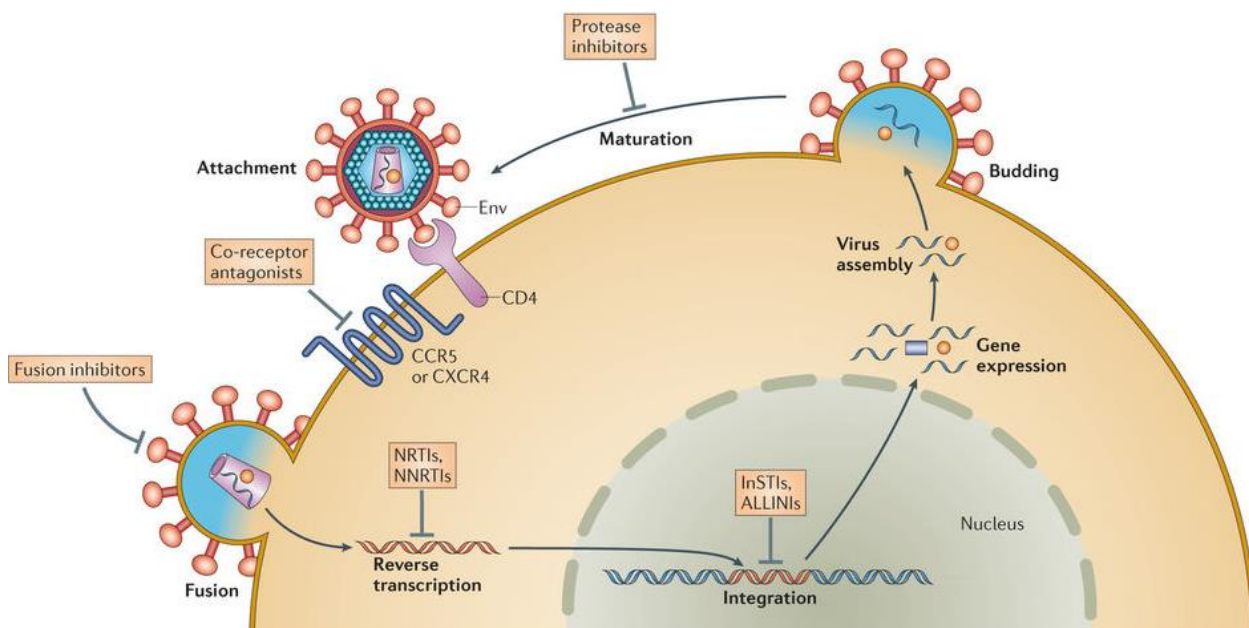
Les hôtes non-naturels infectés par le VIS présentent une haute virémie [77], une perte significative de lymphocytes T CD4+ au cours de l'infection aiguë [78], des niveaux élevés d'activations immunitaire innée et adaptative [79], et l'incapacité du système immunitaire cellulaire et humorale à contrôler la réplication virale [20]. Ces caractéristiques font des macaques rhésus un modèle d'étude pertinent, car on les retrouve chez l'homme au cours d'une infection par le VIH. Les hôtes naturels du VIS préservent un niveau stable de lymphocytes T CD4+ périphériques [80, 81]. Ils préservent également une immunité mucoale avec des taux normaux de cellules intestinales et une absence de translocation microbienne [80, 82]. La fonction et l'architecture des ganglions lymphatiques, et la régénération des cellules lymphocytaires ne sont pas perturbées [80, 83]. De plus, il y a une absence d'activation immunitaire chronique (phénomène impliquée dans la pathogenèse virale) [84, 85]. Le haut niveau d'anti-inflammatoire comme TGF- β et d'IL-10 dans le plasma réduit l'inflammation et l'activation des lymphocytes T [86]. Aussi, les LT CD4+ expriment un faible niveau de corécepteurs et sont moins infectés [87]. Plusieurs hypothèses

sont émises quant aux mécanismes d'acquisition du phénotype non pathogénique des hôtes naturels, la principale étant la coévolution des souches de VIS et leurs hôtes en région africaine [88].

1.4 Stratégies thérapeutiques contre le VIH/VIS

Les thérapies antirétrovirales (TAR) inhibent différentes étapes de la réplication virale et permettent de garder la charge virale à un niveau indétectable dans le sang. Ceci évite les patients d'en arriver au stade SIDA. Ce traitement de première ligne permet aux patients séropositifs d'avoir une meilleure qualité vie [89]. Il existe plusieurs classes de médicaments selon leur fonction anti-VIH, approuvés par la FDA et mis sur le marché pharmaceutique [90] (Figure 8) :

- **Les inhibiteurs d'entrée** peuvent agir : au niveau de la liaison entre le récepteur de surface CD4 et la molécule d'enveloppe virale gp120 ; au niveau du corécepteur CCR5 agissant comme antagonistes compétitifs ; au niveau de la fusion de l'enveloppe virale et la membrane cellulaire.
- **Les inhibiteurs de transcriptase inverse**, classés en deux catégories : les inhibiteurs non-nucléosidiques de la transcriptase inverse (NNRTIs) et inhibiteurs nucléosidiques de la transcriptase inverse (NRTIs).
- **Les inhibiteurs d'intégration** d'ADN viral dans le génome de la cellule hôte.
- **Les inhibiteurs de protéase (PI)**, qui inhibent la maturation des virions après leur libération de la membrane plasmique de la cellule. Le tableau suivant, adapté de *Eric J. Arts et al.* [91] résumant les différentes classes d'antirétroviraux :



Nature Reviews | Microbiology

Figure 8. Les étapes du cycle de vie du VIH-1 ciblées par les antirétroviraux. Sarah B. Laskey et Robert F. Siliciano, Nature Reviews Microbiology, 2014.

Classes d'antirétroviraux	Site d'action	Exemples	
Inhibiteurs d'entrée	Liaison CD4	Ibalizumab	
	Liaison CCR5	Maraviroc	
	Fusion	Enfuvirtide	
Inhibiteurs de transcriptase inverse	NNRTI	Rétrotranscription	Efavirenz, Etravirine
	NRTI	Rétrotranscription	Abacavir, emtricitabine
Inhibiteurs d'intégration	INSTI	Intégration de l'ADN viral	Raltegravir, Dolutegravir,

Tableau 1. Classes d'antirétroviraux.

1.5 Cellules cibles du VIH : sources de réservoirs

1.5.1 La lignée lymphoïde

Les cellules de la lignée lymphoïde sont l'une des principales cibles du VIH. Comme mentionné précédemment, les lymphocytes ayant à leur surface le récepteur CD4 permettent l'infection cellulaire par le virus. Au cours d'une infection, il est démontré que les populations lymphocytaires les plus infectées sont les LT CD4 effectrices qui permettent une dissémination virale majeure [92]. En effet, la réplication du virus est davantage efficace si la cellule hôte est active, car l'activité cellulaire favorise les étapes du cycle de réplication qui sont associées aux différents acteurs moléculaires au sein de la cellule [93]. Les LT CD4 au repos limitent la réplication virale en raison d'une couche rigide d'actine corticale qui recouvre la cellule, inhibant l'entrée du virus [94]. Les cellules T CD4+ mémoires, quiescentes, correspondraient à contrario aux réservoirs cellulaires du VIH. Il est supposé que la latence est établie lorsqu'une cellule infectée de manière productive retourne dans un état de repos, piégeant le virus dans un état latent [93]. Après réactivation de ces cellules mémoires, la dissémination virale reprendrait son cours [95].

1.5.2 L'existence de réservoirs viraux sous TAR

En dépit des traitements antirétroviraux (TAR) hautement actifs capables de contrôler la réplication virale conduisant à son absence de détection dans le sang, l'interruption des traitements a mis en exergue la persistance virale conduisant ainsi en quelques semaines à un rebond de la virémie plasmatique [96]. Ces données suggèrent que malgré un contrôle de la réplication virale dans le sang et les ganglions lymphatiques périphériques sous TAR, les réservoirs viraux résiduels, participant au rebond viral, se localiseraient dans les tissus qui restent à déterminer [97]. Au niveau tissulaire, le principal réservoir suspecté est la rate, bien que les études récentes montrent que le cerveau ainsi que d'autres organes pourraient être réservoirs. Au niveau cellulaire, les réservoirs viraux suspectés sont particulièrement les lymphocytes T CD4 mémoires centrales (Tcm), les lymphocytes T CD4+ mémoires transitionnelles (Ttm) [95] et les cellules Tfh [98]; ces dernières se trouvant d'ailleurs en grande partie dans la rate [99]. Les Tcm possèdent une faible capacité de prolifération cellulaire mais une longue survie cellulaire. En revanche, les Ttm sont susceptibles d'être réservoir du fait de leur capacité de prolifération homéostatique pour maintenir un niveau stable de LT CD4 infecté [95].

En effet, la taille et la persistance du réservoir du VIH sont dirigées par la survie des lymphocytes T et la prolifération homéostatique des cellules lymphocytaires [95].

C'est pourquoi, l'étude des réservoirs est un point majeur dans la lutte contre le VIH, afin de mettre en lumière les mécanismes d'établissement de réservoirs viraux. Cela permettrait à long terme la mise au point de nouvelles stratégies thérapeutiques dans le but d'éradiquer le virus de l'organisme.

1.5.3 La lignée myéloïde

1.5.3.1 Diversité des cellules myéloïdes

Ces cellules à courte demi-vie se développent initialement dans la moelle osseuse à partir de la division des monoblastes qui peuvent ensuite circuler dans l'ensemble de l'organisme, particulièrement durant une infection microbienne [100]. Parmi ces cellules, se trouvent les monocytes et les macrophages [101, 102] et les cellules dendritiques (DCs) [103]. Les monocytes spléniques représentent un vaste réservoir de cellules non différenciées pouvant être mobilisées en réponse à une lésion [104]. En outre, les monocytes sanguins qui se développent également dans la moelle osseuse jouent un rôle essentiel dans la reconstitution de la population macrophagique de l'intestin, dans lequel CCR2 est essentiel [105, 106]. D'ailleurs, il a été montré en 1985 grâce au modèle murin que les macrophages de l'intestin représentent le plus grand pool de phagocytes mononucléaires de l'organisme [107].

Le macrophage et la cellule dendritique myéloïde dérivent des cellules monocytaires, en lien avec le milieu cytokinique [108]. Ils viennent tous deux de cellules monocytaires précurseurs « monocyte-dendritic cell progenitor », les MDPs. L'expression de l'intégrine membranaire CD11b et la perte d'expression de l'intégrine CD11c guideront les cellules MDP à se différencier en monocytes inflammatoires qui se différencieront ultérieurement en macrophages. Après la différenciation, ces cellules de phénotype CD11b⁺ CD11c⁻ peuvent exprimer ou non d'autres récepteurs membranaires qui vont déterminer les sous-populations de macrophages. Les monocytes sanguins présentent 3 phénotypes distincts (CD14⁺,

CD14⁺CD16⁺, et CD16⁺) aux caractéristiques fonctionnelles distinctes [109-111]. L'expression de la molécule CD14 à leur surface détermine les macrophages dits classiques et ayant une capacité phagocytaire importante. La principale fonction de CD14 est la détection des LPS bactériens (lipo-polysaccharides). Ces cellules se trouvent particulièrement dans le sang et les tissus inflammatoires. Elles expriment un haut niveau de CCR1 ou CCR2 migrant facilement en réponse à CCL2 et CCL3. La perte du récepteur CD14 et l'acquisition de l'expression de la molécule CD16 oriente les macrophages en cellules dites non-classiques exprimant un haut niveau de CX3CR1 et migrent en réponse à CX3CL1 [112, 113]. CD16 ou FcγRIII est un récepteur intervenant dans le processus ADCC (*Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity*) communément appelé «cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps » [114].

D'autre part, dans la moelle osseuse, lorsqu'une cellule précurseur MDP augmente l'expression de l'intégrine CD11c et perd l'expression de la molécule CD11b, celle-ci se différencie en précurseur commun de cellules dendritiques CDP ou « common progenitor of DC ». L'environnement cytokinique et l'expression de différents facteurs de transcription guident alors une cellule CDP à se différencier en cellule dendritique plasmocytoïde (pDC) ou en deux populations de cellules dendritiques myéloïdes conventionnelles mDC1 et mDC2 (ou cDC1 et cDC2) [115-117]. Les pDC jouent un rôle primordial dans la sécrétion de l'interféron de type 1 (IFN-1) ayant des propriétés antivirales et dans l'activation des lymphocytes B [118, 119]. Les cDC1s contrôlent les réponses immunitaires contre les virus et les pathogènes intracellulaires en amorçant les LT CD8 naïves, en réactivant les LT CD8 mémoires et induisant les cellules Th1 et Treg. Les cDC2s déclenchent plutôt une réponse contre les bactéries et les champignons extracellulaires en induisant les cellules Th17, Th2 et Tfh[120].

1.5.3.2 Infection des cellules myéloïdes

Les cellules de la lignée myéloïde sont également cibles du VIH/VIS, car certaines d'entre elles possèdent le récepteur CD4 et des récepteurs aux chimiokines, importantes pour l'infection.

Au niveau des muqueuses, il est proposé qu'une des premières cibles du virus soit les DCs. Ces dernières qui sont spécialisées dans la présentation antigénique peuvent favoriser les infections virales subséquentes des LT CD4 en migrant dans le sang périphérique et les tissus [121].

Par ailleurs, plusieurs études ont initialement montré que les monocytes circulants peuvent être infectés de façon latente et l'infection productive peut être initiée durant la différenciation des macrophages [122-124]. Il a été aussi proposé qu'une infection productive coïncide avec l'entrée dans la phase G1/S du cycle cellulaire et que le GM-CSF est l'une des principales cytokines qui favorise et entretient l'infection productive [122, 125-128]. En effet, *in vivo* les cellules CD14⁺ peuvent contenir dès le 7^{ème} jour d'infection par le VIH, 10 fois plus d'ADN viral que les LT CD4 [127]. De plus, les phagocytes mononucléaires non-proliférateurs, qui sont relativement résistantes à l'effet destructeur du virus, peuvent servir de réservoir persistant et productif du VIH [129].

Ulérieurement, il a été proposé par *Triques K. et al.* [130] dans un modèle expérimental *in vitro* une plus grande résistance des monocytes à l'infection par le VIH-1 du fait de leur faible concentration en dTTP par rapport aux macrophages différenciés. D'autres études récentes montrent *in vitro* que la protéine Vpx facilite l'infection des cellules macrophagiques en restreignant l'activité de SAMHD1 [131].

Toutefois, cette protéine Vpx absente du génome de VIH-1 est présente chez les virus simiens pathogènes et non pathogènes, mais aussi dans le génome de VIH-2 [132]. Ceci pose la question du rôle de Vpx dans la pathogenèse. De plus, l'étude de *Calantone et al.* [133] montre que lors de l'utilisation d'un VIS sans Vpx, il n'y a pas d'effet significatif sur la présence d'ADN viral entre monocytes et lymphocytes T.

Plusieurs travaux ont indiqué que durant une infection par le VIH ou par le VIS, les niveaux d'ARN viral étaient plus élevés dans la population sanguine de CD14⁺, bien que les niveaux d'ADN viral étaient similaires dans les différentes sous-populations de monocytes [134-136]. Au cours de l'infection virale, les monocytes CD14⁺ exprimant CD16 sont augmentés [137]. Les travaux de *Ancuta P. et al.* soulignent le fait que les monocytes CD16⁺ exposés au VIH favorisent une réplication virale extrêmement efficace lors de la différenciation en macrophages et de l'interaction avec les cellules T [138, 139]. De plus,

une étude a montré que les monocytes CD16⁺ hébergent de préférence l'ADN du VIH chez des individus infectés par le VIH sous TAR [140].

D'autres types cellulaires d'origine embryonnaire peuvent également être infectés par le VIH/VIS tels que les microglies du système nerveux central (SNC) [141, 142].

Chapitre 2 : Hypothèse et objectifs

La problématique des réservoirs cellulaires et tissulaires du VIH reste à ce jour un thème d'investigation prioritaire. Par conséquent, en regard des études antérieures, il est évident que les travaux actuels doivent se concentrer sur des organes autres que le sang et les ganglions périphériques, car il existe une éradication complète du virus dans ces organes sous TAR [96]. Lors d'une infection, il existe une dissémination précoce du virus dans l'ensemble de l'organisme, associée à un établissement précoce de réservoirs viraux sous traitement antirétroviral. D'autre part, lors d'une thérapie administrée très précocement chez le Macaque rhésus, le rebond viral ne provient ni du sang, ni des ganglions périphériques. Il se pose donc la question sur la nature des sites anatomiques et des cellules infectées sous TAR. De plus, étant donné que les cellules monocytaires sont des cellules cibles du virus et qu'un nombre significatif de monocytes/macrophages circulants colonisent la région intestinale, l'hypothèse que nous avons émise est la suivante :

Les cellules myéloïdes constitueraient un réservoir potentiel du VIH dans les organes profonds, principalement ceux de l'intestin, causant le rebond viral après l'arrêt de traitement antirétroviral.

Afin de répondre à cette hypothèse, mon premier objectif a été de quantifier l'ADN et l'ARN viral dans les sous populations monocytaires de l'intestin comparativement au sang, au cours de l'infection naturelle du VIS.

Par la suite, mon deuxième objectif a été de quantifier cet ADN et ARN viral au cours d'une thérapie antirétrovirale (TAR).

Enfin, mon troisième objectif visait à déterminer les conséquences d'une interruption de TAR (ATi) sur l'infection de ces cellules.

Chapitre 3 : Matériel et méthodes

Afin d'atteindre mes objectifs, des macaques rhésus (RM) ont été utilisés comme modèle animal pour permettre l'analyse des compartiments difficilement accessibles chez l'homme, en particulier le tube digestif.

3.1 Macaques rhésus et infection par le VIS

3.1.1 Statut éthique

Les RMs ont été hébergés à l'Université Laval conformément aux règles et aux règlements du Conseil canadien de protection des animaux (<http://www.ccac.ca>). Le protocole a été approuvé par le Comité de la protection des animaux de l'Université Laval (numéro de projet 106004). Les animaux ont été nourris avec un régime alimentaire standard additionné de fruits et de légumes et d'eau à volonté. L'enrichissement social a été assuré et supervisé par le personnel vétérinaire et contrôlée quotidiennement. Les animaux ont été évalués cliniquement et sacrifiés sans cruauté en utilisant une surdose de barbituriques selon les directives en vigueur au Canada.

3.1.2 Animaux et inoculation virale

Durant ma maîtrise, seize RMs séronégatifs pour le VIS, le STLV-1 (Simian T leukemia Virus type-1), le SRV-1 (rétrovirus de type D) et les virus de l'herpès de type B ont été infectés avec du SIVmac251 à une dose de 20 DIA50 (dose infectieuse pour 50% des animaux). L'inoculation virale a été effectuée en intraveineuse. Au jour 4 après l'infection, onze d'entre eux ont été traités avec un cocktail d'antirétroviraux composé de Tenofovir (TFV, 20mg/kg, GILEAD), Emtricitabine (FTC, 40mg/kg, GILEAD), Raltegravir (RGV, 20mg/kg, MERCK) ou Dolutegravir (DTG, 5 mg/kg, ViiV), Indinavir (IDV, 2mg/kg, MERCK) et Ritonavir (RTV, 20mg/kg; Abbvie). Les RMs ont été sacrifiés à différents temps post-infection durant l'infection naturelle (n=5), sous thérapie antirétrovirale (n=5), et après l'interruption de TAR (n=6) (Figure 9 et Tableau 2).

Pendant toute la durée du protocole, des prélèvements sanguins ont été effectués pour un suivi longitudinal des animaux. Pour chaque point de prélèvement sanguin, un hémogramme a été réalisé à l'aide d'un instrument d'hématologie Abaxis VetScan HM5 (Abaxis, CA). Un marquage membranaire par des anticorps spécifiques (anti-CD3, CD4) a été réalisé pour analyse en cytométrie en flux, afin de rendre compte de la dynamique des lymphocytes T CD4 au cours de l'infection.

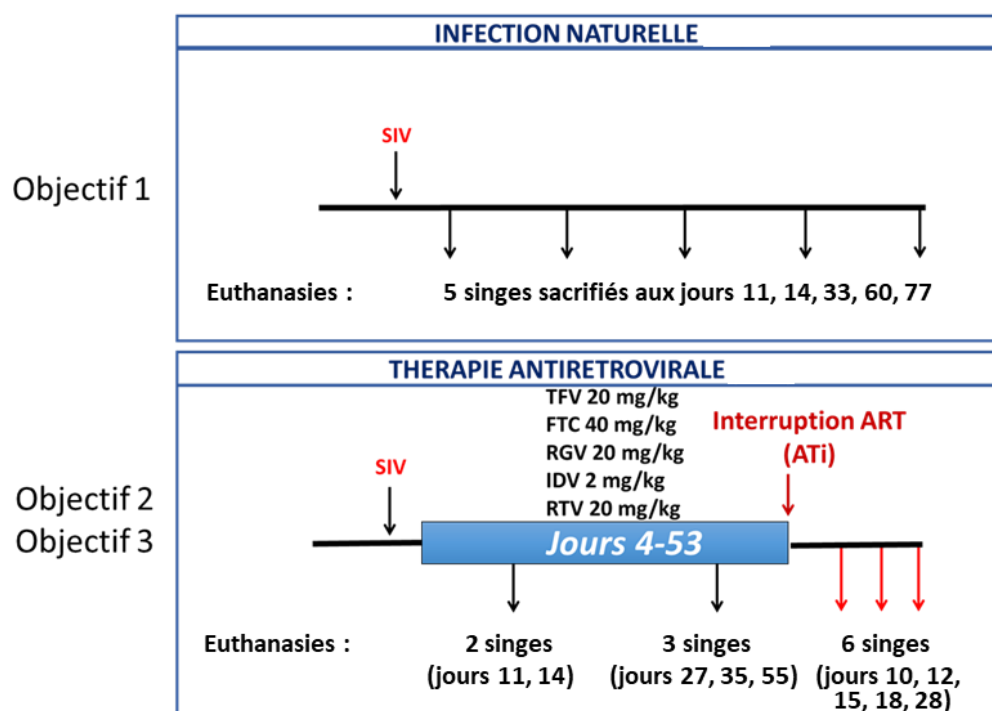


Figure 9. Schéma 1 du protocole expérimental

INFECTION NATURELLE	JOUR D'EUTHANASIE
PB041	11
PB051	14
9051222	33
9082012	60
122070R	77
TAR	
R110806	11
111466R	14
R110562	27
R110360	35
121836R	55
POST-TAR	
R110482	10
121888R	12
R110804	15
131134R	15
11-1430R	18
131878R	28

Tableau 2. RMs infectés par le SIV.

3.1.3 Prélèvement et préparations d'échantillons

A chaque euthanasie, le sang et les tissus profonds tels que le colon, le jéjunum, et l'iléon ont été récupérés immédiatement pour l'analyse cellulaire. Les cellules mononuclées du sang périphérique (PBMC) ont été isolées du sang total (avec héparine) par gradient de densité en utilisant la technique du Ficoll (Figure 10). Celle-ci permet de séparer les PBMC, qui se situent à la limite supérieure de la couche de Ficoll, des autres cellules sanguines plus denses, qui sédimentent au fond du tube. Les cellules récupérées ont ensuite été lavées avec du RPMI complété avec 10% de FBS, 1mM de Sodium Pyruvate et 1% de Penicillin-Streptomycin-Glutamine à 50 mg/mL. Les cellules issues des compartiments intestinaux ont été isolées après une isolation mécanique. Ces derniers ne sont pas traités à la collagénase ou à d'autres protéases pour limiter les effets négatifs sur l'expression des récepteurs de surface cellulaires en particulier celle de la molécule CD14. Les cellules du jéjunum et de l'iléon ont été regroupées pour une question de quantité de cellules.

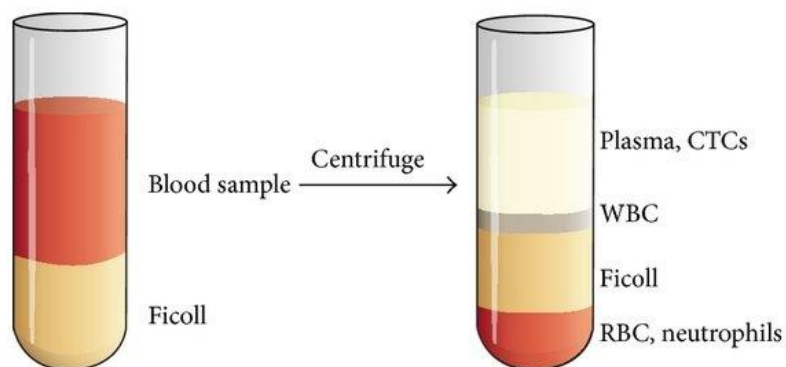


Figure 10. Principe de la méthode de séparation cellulaire par centrifugation en densité (Ficoll). Wan Shi Low et Wan Abu Bakar Wan Abas, BioMed Research International, 2015 [143].

3.2 Tri cellulaire

Les cellules issues du sang, du colon et du jéjunum/iléon (10^8 cellules) ont été triées à l'aide d'un trieur de cellules BD Influx (Becton Dickinson) en utilisant des anticorps spécifiques: anti-CD3, CD4, CD20, HLA-DR, CD14 et CD16 (Tableau 3). Afin d'isoler les monocytes/macrophages, les cellules CD3 et CD20 ont été exclues puis les populations ont séparées selon l'expression de la molécule HLA-DR⁺. Trois sous-populations de monocytes ont ensuite été triés à partir des cellules HLA-DR⁺. Ces trois populations sont : CD14⁺ CD16⁻, CD14⁺ CD16⁺ et CD14⁻ CD16⁺. Parallèlement, les cellules T CD4⁺ ont été également triées à partir de cellules T CD3⁺ et CD20⁻ pour faire une analyse comparative. Les échantillons ont été conservés à -80°C jusqu'à leur utilisation pour l'analyse de d'ADN ou en trizol (Invitrogen) pour la quantification d'ARN cellulaire, en RT-qPCR.

Récepteurs	Fluorochrome	Clone	Manufacturier
CD3	Alexa 700	SP34-2	BD Biosciences
CD20	APC-H7	2H7	BD Biosciences
CD4	V500	L200	BD Biosciences
HLA-DR	PerCP	L243	Biolegend
CD14	FITC	M5E2	BD Biosciences
CD16	PeCy7	3G8	BD Biosciences

Tableau 3. Anticorps utilisés.

3.3 Quantification d'ADN et d'ARN viral par RT-qPCR

3.3.1 Quantification de la charge virale plasmatique

Pour quantifier les charges virales plasmatiques de RMs infectés par le VIS, l'extraction d'ARN virale a été effectuée avec 200 µL de plasma à l'aide du kit PureLink Viral RNA/DNA (Invitrogen). Les ARN viraux ont ensuite été quantifiés par RT-qPCR. Le mixte de PCR était composé d'un mélange de TaqMan Fast Virus 1-Step Master Mix (Applied Biosystems), de 750 nM d'amorces et de 200 nM de sonde. Les amorces et les séquences de sonde sont énumérées dans le Tableau 4. Un plasmide codant pour le gène gag de SIVmac251 a été utilisé comme standard. Des dilutions sériées du plasmide SIVmac251 ont été effectuées pour générer une courbe standard, commençant à 10⁹ copies/ul de VIS. Les amplifications ont été effectuées avec un système PCR en temps réel QuantStudio 6 Flex (Applied Biosystems), en utilisant les paramètres suivant: 50°C pendant 5 minutes, 95°C pendant 20 secondes, 40 cycles (95°C pendant 15 secondes, 60°C pendant 1 minute). Les échantillons ont été analysés en double et les résultats ont été exprimés en copies d'ARN viral par millilitre de plasma.

3.3.2 Quantification d'ARN et d'ADN viral associés aux cellules

3.3.2.1 Quantification d'ARN viral cellulaire

La quantification de l'ARN viral associé aux cellules a été réalisée à partir de 100 millions de cellules triées gardées dans 500 µL de trizol. L'ARN viral a été extrait avec la procédure au trizol selon les instructions du fabricant et remis en suspension dans 50 µl d'eau sans RNase (Invitrogen). Les traces d'ADN génomique ont été éliminées des échantillons d'ARN en utilisant un kit Turbo-DNA free (Invitrogen). Après chaque extraction, les extraits d'ARN ont été analysés au NanoDrop pour vérifier leurs puretés et leurs intégrités. Pour la quantification, 5 µl d'ARN ont été amplifiés par RT-qPCR, selon les mêmes conditions d'amplifications de la charge virale plasmatique. Afin d'obtenir une estimation du nombre de copie d'ARN du virus par cellule, l'ARN18S a été également amplifié. Pour cela, le mixte

Eukaryotic 18S rRNA Endogenous Control (Lifetechnologies) a été utilisé. Les amorces et les séquences de sondes sont énumérées dans le Tableau 4. Les résultats sont exprimés en nombre de copies d'ARN de VIS pour 10^6 cellules.

3.3.2.2 Quantification d'ADN viral

La quantification de l'ADN viral cellulaire a été réalisée à partir des mêmes populations triées. L'ADN a été purifié à l'aide du kit Genomic DNA Tissue kit (Macherey Nagel). Après élution, 10 μ L ont été amplifiés par PCR nichée avec des amorces spécifiques de SIVmac251 entourant la région codante pour nef selon le protocole décrit dans l'article *Monceaux et al.* (2003) [59]. Un premier cycle de PCR a été réalisé en utilisant un mixte composé de 50 nM d'amorces preco et K3, de 0,8 mM de DNTP (Invitrogen), de 2 mM de $MgCl_2$, et de 1,25 U d'AmpliTaq (Applied Biosystems). L'amplification a été fait dans un thermocycleur Biometra en utilisant les paramètres suivants : 95°C pendant 1 minute et 45 secondes, 45 cycles (95°C pendant 30 secondes, 60°C pendant 30 secondes et 72°C pendant 1 minute et 10 secondes), 72°C pendant 6 minutes. On utilise 5 μ l de produit de PCR qui sont réamplifiés dans un système de PCR en temps réel QuantStudio 6 Flex (Applied Biosystems) en utilisant un mixte composé de 250 nM d'amorces et de sonde SIV-DNA et de 2X PrimeTime® Gene Expression Master Mix (IDT). Les paramètres d'amplification PCR ont été : 95°C pendant 3 minutes, 45 cycles (95°C pendant 15 secondes, 60°C pendant 1 minute). Les échantillons ont été analysés en quadruple en raison des faibles niveaux d'ADN viral sous TAR et les résultats sont exprimés en nombre de copies d'ADN de SIV pour 10^6 cellules. Pour la quantification de l'ADN, la lignée cellulaire SIV-1C, qui contient une copie de l'ADN SIVmac251 par cellule, a été utilisée. Des dilutions en série de cellules SIV-1C avec des cellules porteuses CEMX174 ont été effectuées pour générer une courbe standard.

3.3.2.3 Quantification d'ADN viral rétrotranscrit précocément (R-U5)

À partir de l'ADN élué, 5 µl sont amplifiés à l'aide du kit 2X Quantitec Sybr Green PCR Kit (Qiagen) et 250 nM d'amorces spécifiques dans un système de PCR en temps réel QuantStudio 6 Flex (Applied Biosystems). Les paramètres suivants ont été utilisés: 50°C pendant 2 minutes, 95°C pendant 15 minutes, 40 cycles (94°C pendant 15 secondes à, 60°C pendant 30 secondes et 72°C pendant 35 secondes), suivis d'une étape de dissociation. Un plasmide contenant la séquence d'ADN du SIV R-U5 a été utilisé pour générer une courbe standard. Les résultats sont exprimés en copies d'ADN de R-U5 SIV par 10⁶ cellules. Les séquences d'amorces sont répertoriées dans le Tableau 4. Pour estimer le nombre de cellules dans chaque échantillon et comme contrôle interne, l'ADN ribosomal 18S a été amplifié parallèlement, avec le kit 2X Quantitec Sybr Green PCR Kit (Qiagen) et 250 nM d'amorces spécifiques dans un système PCR en temps réel QuantStudio 6 Flex (Applied Biosystems).

	Amorces et sondes	Séquences de nucléotides 5'-3'
SIV	SIV _{mac-F}	GCA GAG GAG GAA ATT ACC CAG TAC
	SIV _{mac-R}	CAA TTT TA CCC AGG CAT TTA ATG TT
	SIV _{mac-Probe}	6FAM TGT CCA CCT GCC ATT AAG CCC GA TAMRA
	R-U5-For	AAG CTA GTG TGT GTT CCC ATC T
	R-U5-Rev	CAC TTA CCT GCA ACC GGA GG
	SIV DNA-Preco	CAG AGG CTC TCT GCG ACC CTA C
	SIV DNA-K3	GAC TGA ATA CAG AGC GAA ATG C
	SIV DNA-For	TCC CTA GGA GGA TTA GAC AAG G
	SIV DNA-Rev	CTC TCT TCA GCT GGG TTT CTC
	SIV DNA-Probe	56FAM AGC TCA CTC ZEN TCT TGT GAG GGA CAG A 3IABkFQ
ADN18S-For	CCT CCA ATG GAT CCT CGT TA	
ADN18S-Rev	AAA CGG CTA CCA CAT CCA AG	

Tableau 4. Amorces et sondes utilisées.

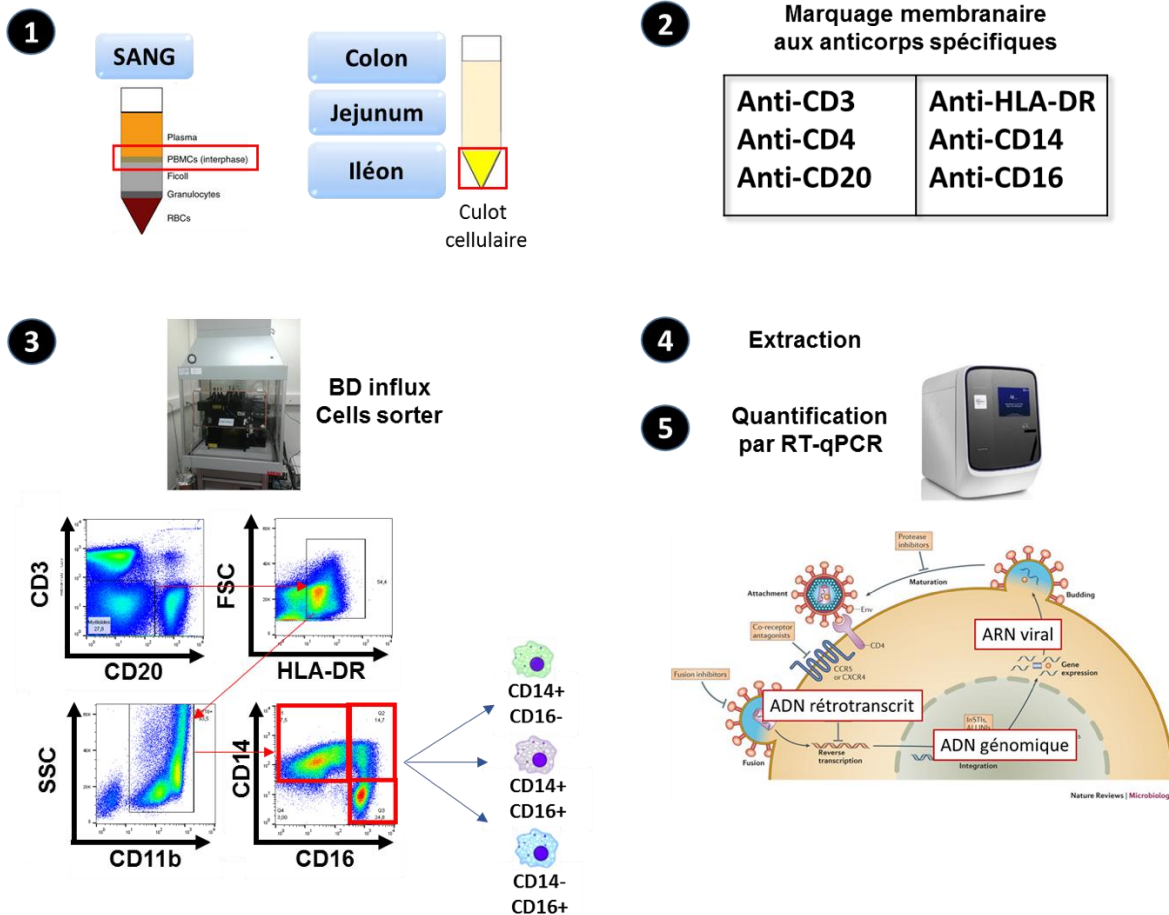


Figure 11. Schéma 2 du protocole expérimental.

(1) Récupération des cellules mononuclées du sang périphérique et des cellules du colon, du jéjunum et de l'iléon. (2) Marquage membranaire aux anticorps spécifiques. (3) Tri cellulaire grâce au trieur BD influx. (4) Extraction d'ADN et ARN cellulaire des cellules triées. (5) Quantification d'ADN viral et d'ARN viral.

3.4 Analyse statistique

Les statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel GraphPad Prism 5. Le test non paramétrique de Mann Whitney et le test t apparié (Wilcoxon test) ont été utilisés à des fins de comparaison, comme indiqué dans les figures. Une valeur de $p < 0,05$ indique une différence significative. Le test de type ANOVA nécessite une variance équivalente entre les différents groupes analysés, ce qui n'a pas été toujours le cas du fait du nombre d'animaux par groupe et de la variance.

Chapitre 4 : Résultats

4.1 Dynamique et infection des monocytes au cours de l'infection naturelle par le VIS

4.1.1 Charge virale plasmatique et dynamique leucocytaire au cours de l'infection naturelle par le VIS

Lors de mon étude sur les RMs infectés naturellement par le VIS, les résultats obtenus à chaque jour de prélèvement sanguin montrent que la charge virale des RMs atteint dès le quatorzième jour 10^6 à 10^8 copies/mL de plasma. Comme attendu et comme décrit dans la littérature, cette charge virale est positivement corrélée avec une déplétion massive du taux de lymphocytes T CD4 par rapport aux lymphocytes T CD8 comme l'indique le ratio CD4/CD8 (jour 0, $1,741 \pm 0,6738$; jour 180, $0,5600 \pm 0,3050$; $p = 0,0001$).

En revanche, cette charge virale élevée est associée à une augmentation du nombre de monocytes sanguins à partir du jour 30 post-infection (jour 0, $0,2076 \pm 0,08491 \times 10^9/L$; jour 180, $0,3840 \pm 0,1284 \times 10^9/L$; $p = 0,0004$).

Le nombre de point par jour dans la Figure 12 (B) et (C) et la figure 14 (B) et (C) ne reflètent pas le nombre d'animaux naturellement infectés car il s'agit de plusieurs suivis que nous avons regroupés à J14, J30 ou J60.

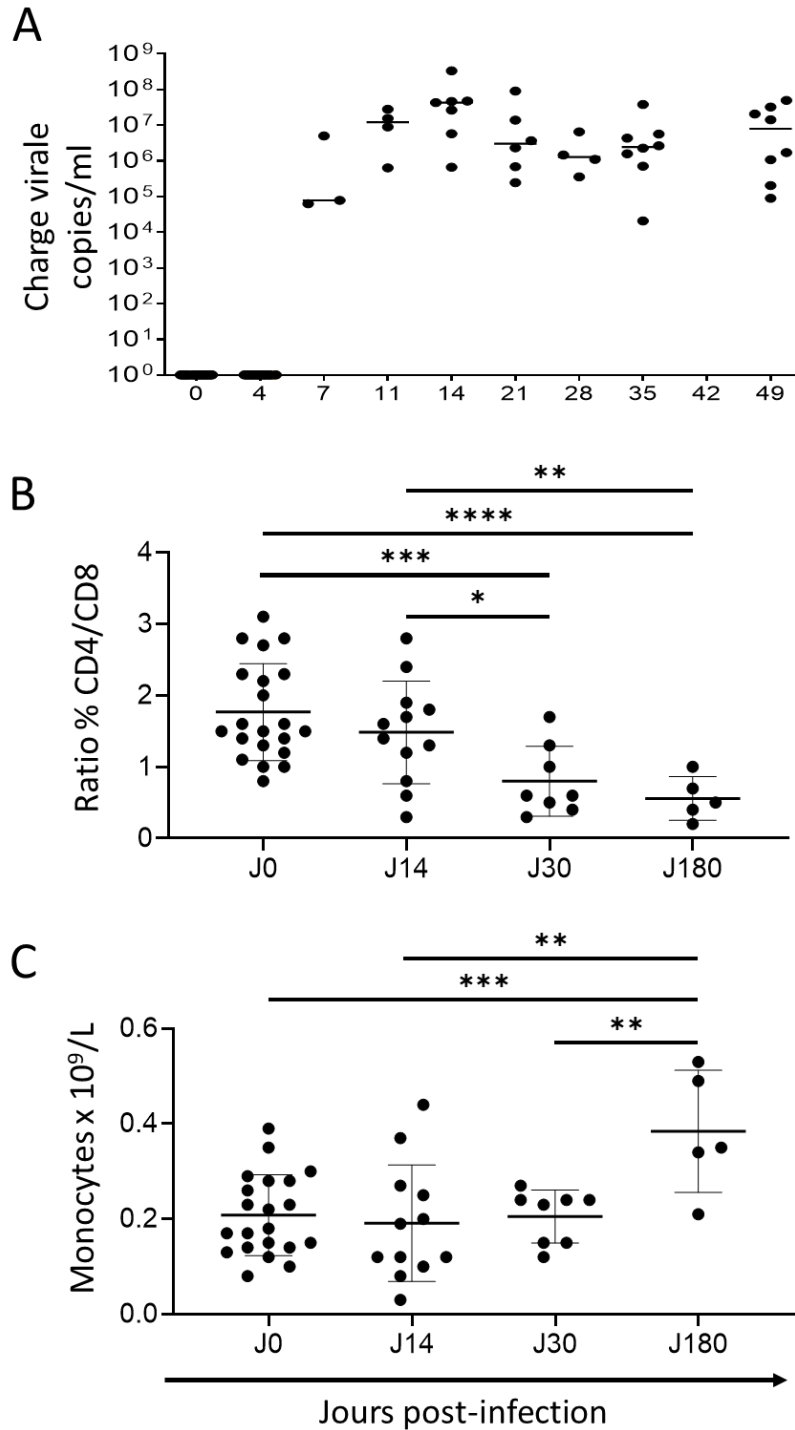


Figure 12. Charge virale plasmatique et dynamique leucocytaire au cours de l'infection naturelle par le VIS. Chaque symbole représente un individu. Le nombre de symbole dans (B) et (C) est supérieur au nombre de singe, du fait de plusieurs prélèvements sanguins qui ont été réalisés. Le test de Mann-Whitney a été effectué, * indique $p < 0,05$; **, $p < 0,01$ et ***, $p < 0,001$.

4.1.2 Cibles du VIS au cours de son infection naturelle

Pour tous les RMs (n=5), dans le sang comme dans les compartiments intestinaux analysés à savoir le jéjunum/iléon (symbole plein, regroupé du fait du nombre de cellules isolées) et le colon (symbole vide), les lymphocytes T CD4 sont porteurs d'un haut niveau d'ADN viral total. Dans le sang, ce niveau d'ADN viral (10^6 copies/ 10^6 cellules, 4667036 ± 4370852) est dix fois supérieur à celui de l'intestin où l'ADN viral est d'environ 10^5 copies/ 10^6 cellules (387071 ± 385076 copies/ 10^6 cellules). Les LT CD4 du colon semble être infectés plus fréquemment (4 échantillons positifs sur 4) que le jéjunum/iléon (2 échantillons sur 3). Nous n'avons pas le même nombre d'animaux pour le colon et le jéjunum/iléon car nous étions limités par le nombre de cellules concernant le jéjunum/iléon (Figure 13).

Parallèlement au LT CD4, les trois sous-populations monocytaires du sang périphérique CD14⁺ CD16⁻, CD14⁺ CD16⁺ et CD14⁻ CD16⁺ contiennent en moyenne 10^5 copies de rétrotranscrits précoces pour 10^6 cellules (214800 ± 459866 copies/ 10^6 cellules), alors que l'ADN viral total atteint 10^3 à 10^4 copies/ 10^6 cellules (21513 ± 35711 copies/ 10^6 cellules). Les rétrotranscrits précoces des monocytes sanguins sont alors 10 fois plus élevé que l'ADN viral total. Pour certains de ces animaux (#9051222, #9082012 et #122070R), il a été mis en évidence de l'ARN viral dans les trois sous populations monocytaires, démontrant une répllication virale. Le nombre d'échantillons d'ARN est ici inférieur à celui de l'ADN, car nous avons privilégié l'extraction d'ADN cellulaire à l'extraction d'ARN pour une question de quantité de cellules.

Concernant les monocytes de l'intestin, seulement trois des cinq singes ont été testés du fait des quantités de matériel disponible. Dans cet organe, deux sous-populations CD14⁺ et CD14⁻ ont été triées le jour des sacrifices car le nombre final de cellules récupérées ne permettaient pas de trier en quantité suffisante les trois populations. Dans le jéjunum/iléon et le colon, nous montrons que les cellules CD14⁻ expriment en moyenne 2 fois plus d'ADN viral que les CD14⁺ (CD14⁻ : 6032 ± 6285 copies/ 10^6 cellules et CD14⁺ : 2556 ± 3279 copies/ 10^6 cellules). De plus, dans les CD14⁻, un seul singe sur les trois exprime l'ADN viral dans le jéjunum/iléon, alors que les trois l'expriment dans le colon. Par ailleurs, nos résultats montrent que ce sont ces cellules qui expriment l'ARN virale suggérant un rôle de cette population dans la production virale. Tout comme le sang, les transcrits précoces sont 10 fois

plus élevés comparativement à l'ADN viral total, soit 10^4 copies/ 10^6 contre 10^3 copies/ 10^6 cellules, et ce, dans les deux sous-populations.

En résumé, durant l'infection naturelle, le virus est capable de rétrotranscrire activement son ARN en ADN, et d'intégrer le génome des trois sous-populations monocytaires, aussi bien dans le sang que dans l'intestin. De plus, l'ARN viral détecté dans les monocytes peut suggérer que ces cellules ont la capacité à produire du virus.

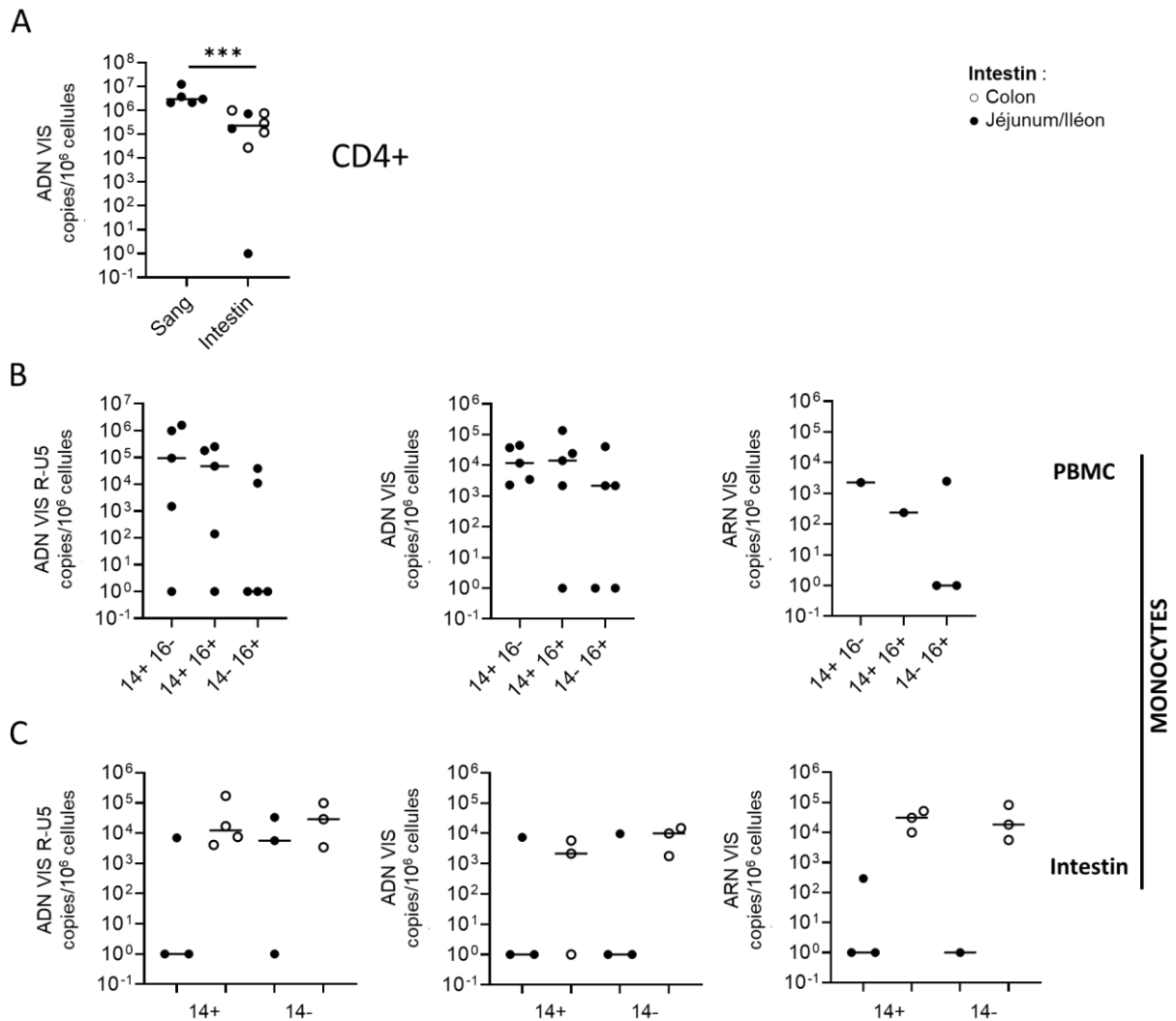


Figure 13. Dynamique de l'infection naturelle du VIS des cellules cibles.

Les fréquences (A) d'ADN viral ont été quantifiées par qRT-PCR dans les LT CD4. Les fréquences d'ADN RU-5, d'ADN viral total et d'ARN viral ont été quantifiées dans les cellules monocytaires triées ($CD14^+ CD16^-$, $CD14^+ CD16^+$ et $CD14^- CD16^+$) de (B) PBMC et (C) l'intestin. Chaque réaction a été effectuée en 2 à 4 réplicats de puits et les valeurs médianes ont été calculées. Chaque symbole représente un individu (n=5). Dans certains cas, le nombre restreint de cellules n'a pas permis de trier trois sous-populations de monocytes

ou de quantifier l'ADN RU-5, l'ADN et l'ARN du VIS. Nous avons donc privilégié la quantification de l'ADN viral. Concernant l'intestin, les sous-populations de monocytes ont été triées du jéjunum / iléon (coloré en noir) et du côlon (coloré en blanc). L'ADN et l'ARN du SIV ont été quantifiés dans les populations CD14+ et CD14- uniquement. Les résultats sont exprimés en copies par 10^6 cellules. Le test de Mann-Whitney a été effectué (* indique $p < 0,05$; **, $p < 0,01$ et ***, $p < 0,001$).

4.2 Dynamique et infection des monocytes sous TAR

4.2.1 Impact de la thérapie précoce sur la dynamique monocyttaire

Onze des seize singes infectés par le SIVmac251 ont été traités par une thérapie antirétrovirale au jour 4 post-infection et cinq d'entre eux ont été euthanasiés. Les résultats de la figure 14 soulignent le fait que l'administration d'une thérapie précoce hautement active diminue fortement la virémie. Chez certains individus, nous observons ponctuellement une virémie (blip). Pour les singes R110562, 111466R et R110806, le pic survient au jour 7; pour les singes R110360 et 121888R le pic survient respectivement au jour 14 et 42; pour le singe 131134R, deux blips ont été observés au jour 11 et 35. Nous pouvons dire que la thérapie antirétrovirale administrée est hautement efficace.

Cette diminution significative est associée à une stabilité du ratio LT CD4/CD8 marquant l'arrêt de la déplétion des lymphocytes T CD4. Par ailleurs, le nombre de monocytes au cours du traitement antirétroviral reste stable de J14 à J60 post infection, bien qu'une légère diminution significative est observée entre J0 et J60 (jour 0, $0,2872 \pm 0,3671 \times 10^9/L$; jour 60, $0,1062 \pm 0,04253 \times 10^9/L$; $p = 0,0432$). Ceci démontre que les résultats obtenus sous infection naturelle est spécifique à l'infection par le VIS.

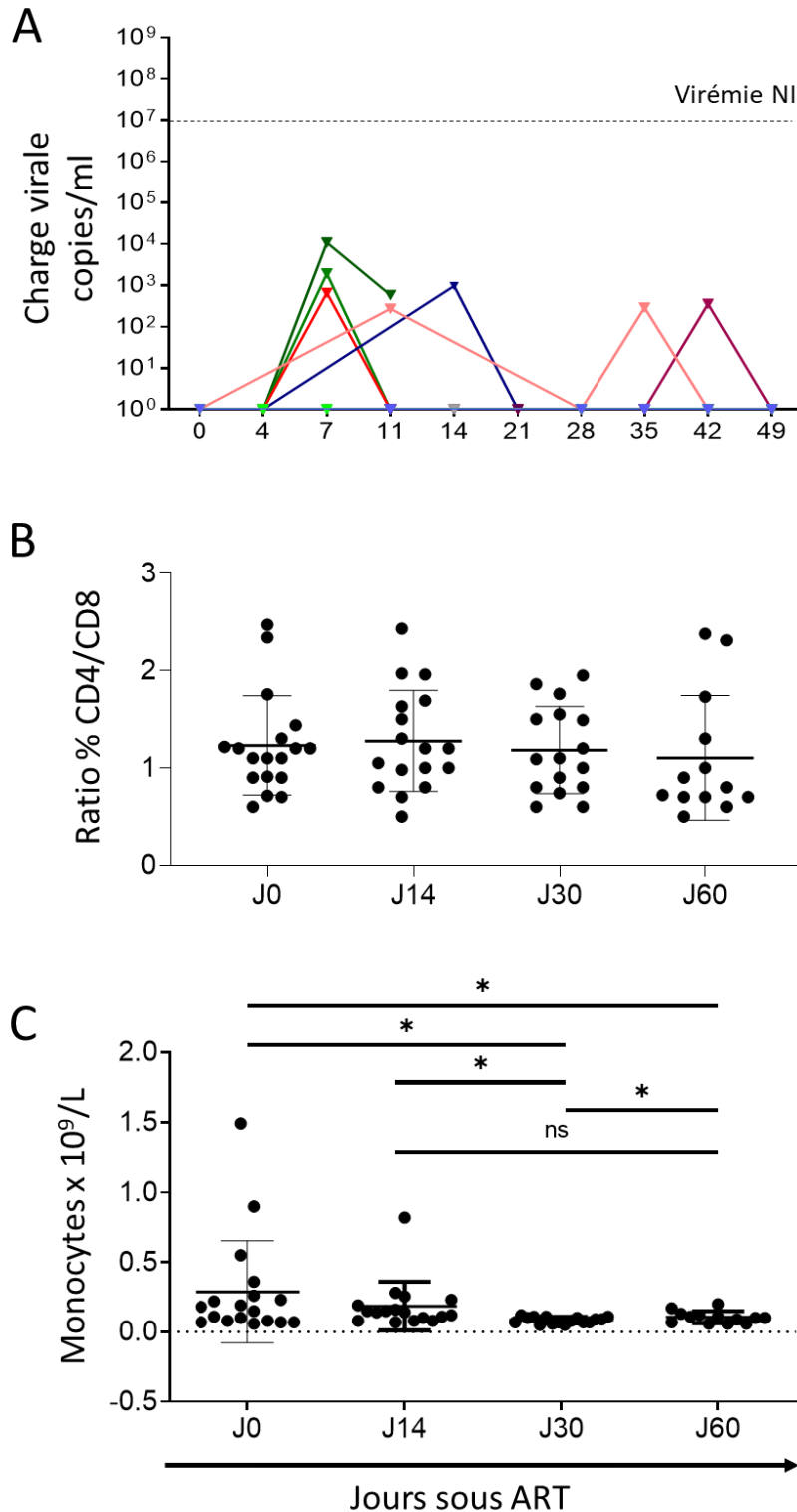


Figure 14. Charge virale plasmatique et dynamique leucocytaire au cours d'une thérapie antirétrovirale. Chaque symbole représente un individu. Le nombre de symbole dans (B) et (C) est supérieur au nombre de singe, du fait de plusieurs prélèvements sanguins qui ont été réalisés. Chez certains individus (n=6), nous observons ponctuellement une

virémie (blip). Pour les singes #R110562, #111466R et #R110806, une virémie est détectable au jour 7 après infection alors que pour les singes #R110360 et #121888R une virémie est observée au jour 14 et 42; pour le singe #131134R, deux blips sont observés au jour 11 et 35. Cette diminution de la virémie est associée à une stabilité du ratio CD4/CD8 marquant l'arrêt de la déplétion des lymphocytes T CD4. Par ailleurs, le nombre de monocytes au cours du traitement antirétroviral reste stable de J14 à J60 post infection, bien qu'une légère diminution significative est observée entre J0 et J60 (jour 0, $0,2872 \pm 0,3671 \times 10^9/L$; jour 60, $0,1062 \pm 0,04253 \times 10^9/L$; $p = 0,0432$). Ceci démontre que la thérapie administrée est hautement efficace à contrôler cette infection. Le test de Mann-Whitney a été effectué (* indique $p < 0,05$; **, $p < 0,01$ et ***, $p < 0,001$).

4.2.2 Infection des monocytes sous TAR

Cinq singes ont été euthanasiés sous traitement antirétroviral. Dans le sang périphérique, la dynamique d'infection cellulaire montre qu'aucun ADN viral n'est détecté sous TAR dans les lymphocytes T CD4, signifiant l'absence d'intégration virale. Parallèlement, nous ne détectons pas de transcrits d'ADN précoces, ni d'ADN viral total, ni d'ARN, dans les trois sous-populations monocytaires CD14⁺ CD16⁻, CD14⁺ CD16⁺ et CD14⁻ CD16⁺. Cette absence de détection suggère qu'une thérapie antirétrovirale éradique le virus dans le sang (Figure 15).

D'autre part, nous observons que les LT CD4 dans l'intestin ne présentent pas d'ADN viral, excepté les cellules coliques du singe #R110806 (5097 copies/ 10^6 cellules). Par ailleurs, parmi les 5 individus sous TAR, toutes les populations myéloïdes sont négatives aussi bien dans les transcrits d'ADN précoces, dans l'ADN et l'ARN viral.

Ces résultats suggèrent alors que l'administration d'un traitement antirétroviral précoce contrôle considérablement l'infection des lignées monocytaires du sang et de l'intestin. Ainsi, l'absence de détection du virus dans les monocytes de l'intestin et le sang indiquent que l'intestin tout comme le sang ne sont pas des réservoirs du VIS sous traitement antirétroviral.

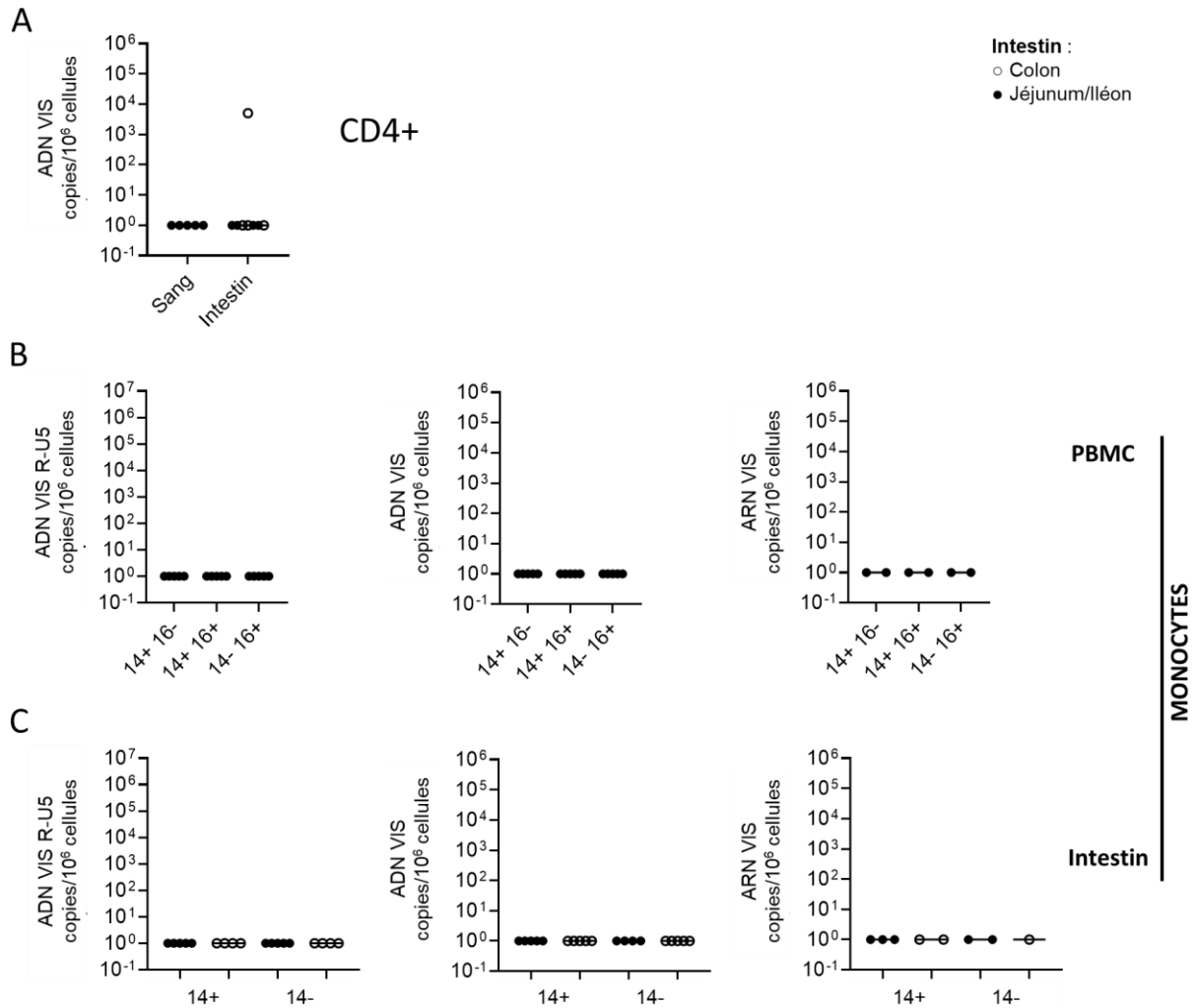


Figure 15. Dynamique de l'infection virale au cours du traitement antirétroviral (TAR).

Les fréquences d'ADN RU-5, d'ADN viral total et d'ARN viral ont été quantifiées dans les cellules monocytaires triées ($CD14^+ CD16^-$, $CD14^+ CD16^+$ et $CD14^- CD16^+$) de (B) PBMC et (C) l'intestin. Chaque réaction a été effectuée en 2 à 4 réplicats de puits et les valeurs médianes ont été calculées. Chaque symbole représente un individu ($n=5$). Dans certains cas, le nombre restreint de cellules n'a pas permis de trier trois sous-populations de monocytes ou de quantifier l'ADN RU-5, l'ADN et l'ARN du VIS. Nous avons donc privilégié la quantification de l'ADN viral. Concernant l'intestin, les quantifications ont été réalisées dans les populations $CD14^+$ et $CD14^-$ uniquement. Les résultats sont exprimés en copies par 10^6 cellules. Le test de Mann-Whitney a été effectué, * indique $p < 0,05$; **, $p < 0,01$ et ***, $p < 0,001$.

4.3 Dynamique et infection des monocytes post-TAR (ATi)

4.3.1 Dynamique des cellules myéloïdes après l'interruption de traitement antirétroviral

Après l'interruption de la thérapie antirétrovirale tous les individus (n=6) présentent une charge virale positive entre 10^4 à 10^5 copies/mL (Figure 16). Ce rebond viral survient à différent temps selon les individus, et ce même si sous traitement, il n'y avait plus de virus détectable dans le sang, ni dans les LT CD4, ni dans les cellules myéloïdes du sang périphérique et de l'intestin. Ces résultats sont en accord avec les études précédentes suggérant qu'un rebond viral survient en 2 à 3 semaines ATi. En regard de cette charge virale, nous avons euthanasié les singes en général trois jours après la première détection.

De façon intéressante, pendant les 30 premiers jours ATi, nous n'observons aucun changement majeur dans le ratio CD4/CD8, indiquant l'absence de déplétion précoce des lymphocytes T CD4 malgré l'arrêt des traitements, contrairement à l'infection naturelle. En effet, une légère augmentation significative du ratio apparaît durant les 14 premiers jours (jour 6, $1,096 \pm 0,4780$; jour 14, $1,609 \pm 0,6287$; $p = 0,0211$), et tend à diminuer durant les 15 jours suivant pour retrouver le ratio initial (jour 14, $1,609 \pm 0,6287$; jour 30, $1,080 \pm 0,3841$ %; $p = 0,0323$).

Ce rebond viral et cette stabilité du ratio LT CD4/LT CD8 sont alors associés à une stabilité du nombre des monocytes pendant le premier mois après l'arrêt de la thérapie. D'ailleurs, ce pourcentage stable est semblable à la période sous TAR.

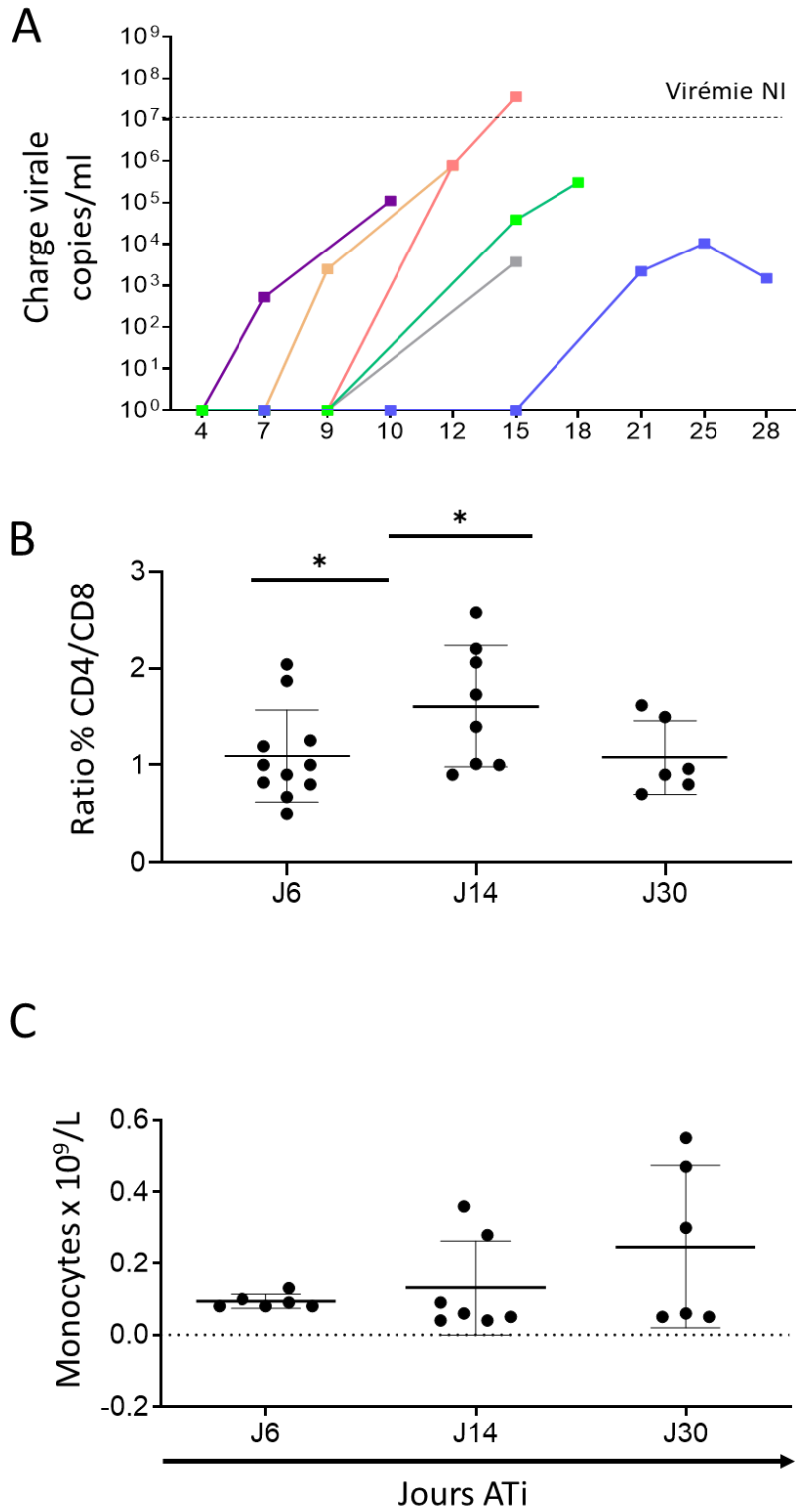


Figure 16. Charge virale plasmatique et dynamique leucocytaire après l'interruption de TAR (ATi). Chaque symbole représente un individu. Le nombre de symbole dans (B) et (C) est supérieur au nombre de singe, du fait de plusieurs prélèvements sanguins qui ont été

réalisés. Le test de Mann-Whitney a été effectué, * indique $p < 0,05$; **, $p < 0,01$ et ***, $p < 0,001$.

4.3.2 Cibles précoces à l'arrêt du traitement

Après l'interruption du traitement, nous observons que dans le sang tout comme dans l'intestin, et ce pour les mêmes singes (#121888R, #131134R et #111430R), les cellules myéloïdes deviennent à nouveau infectées (Figure 17). En effet, dans toutes les sous populations monocytaires, les rétrotranscrits précoces d'ADN viral sont détectés dans le sang, le jéjunum/iléon et le colon à un niveau d'environ 10^4 copies/ 10^6 cellules (sang : 3701 ± 11216 copies/ 10^6 cellules; intestin : 15820 ± 65838). Dans le sang, le niveau d'ADN viral total est similaire dans les trois sous populations myéloïdes (10^4 copies/ 10^6 cellules), alors que la population CD14⁻ semble être plus fortement infectée (19640 ± 37037 copies/ 10^6 cellules) que la population CD14⁺ (7177 ± 16249 copies/ 10^6 cellules) dans l'intestin. D'ailleurs, la fréquence de détection d'ARN viral associés aux monocytes est supérieure dans les cellules CD14⁻ (6 échantillons positifs sur 8, colon et jéjunum/iléon confondu) comparativement aux cellules CD14⁺ (6 échantillons sur 11, colon et jéjunum/iléon confondu). Il en est de même dans le sang où l'ARN viral des cellules CD14⁺ est détecté dans 3 échantillons sur 5, alors que la fréquence de détection est de 4 échantillons sur 5 dans les cellules CD14⁻. Il est intéressant de souligner la similarité d'infection quant aux niveaux d'ADN et d'ARN viral dans le sang et dans l'intestin.

Ces résultats soulignent le fait que les populations monocytaires circulants du sang et des compartiments intestinaux deviennent de nouvelles cibles du virus après l'arrêt de traitement antirétroviral, et présentent en peu de temps, une capacité de production virale. En effet, la présence d'ARN viral indique que les cellules myéloïdes des deux organes sont capables de faire une transcription complète.

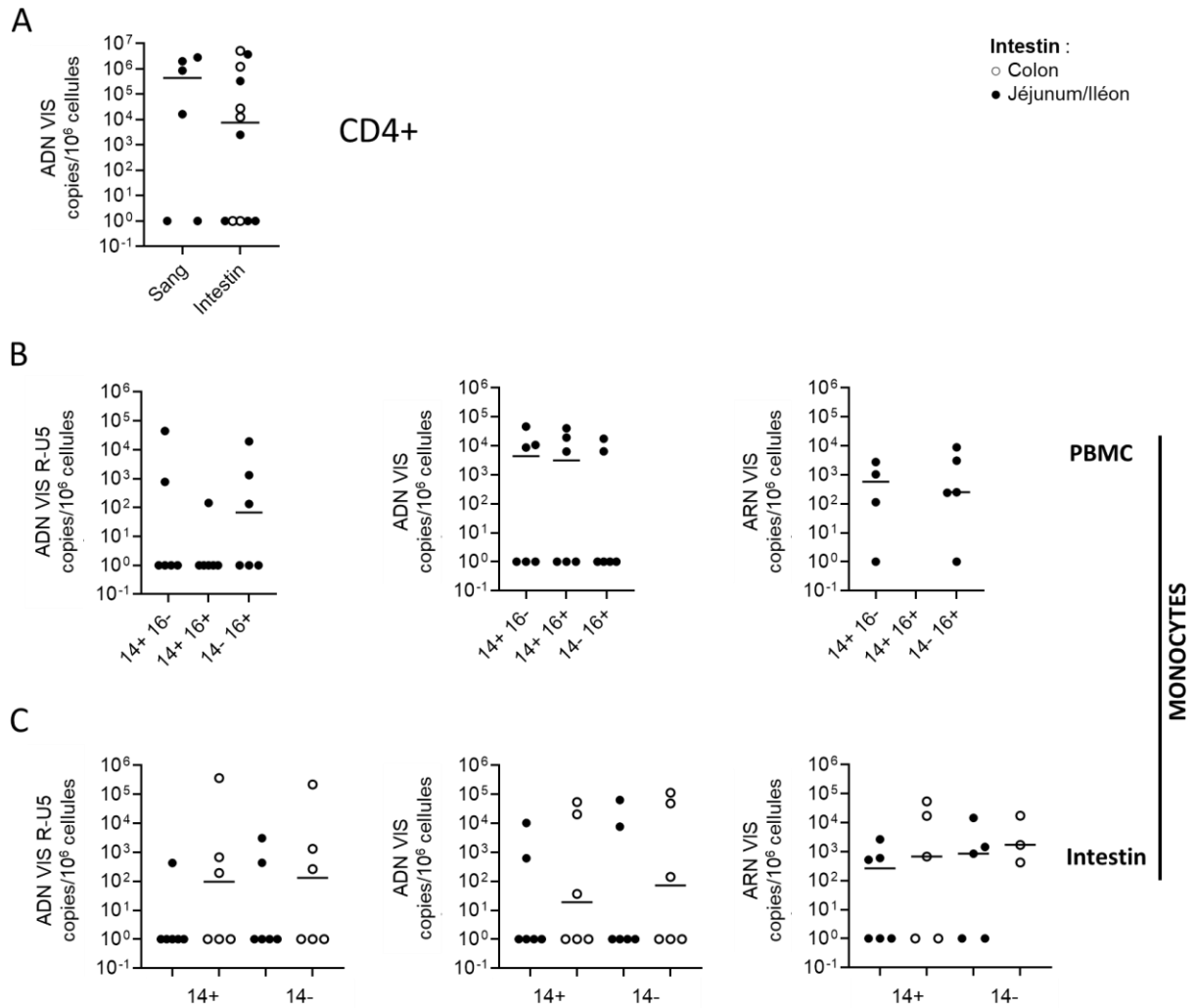


Figure 17. Dynamique de l'infection virale après l'interruption de TAR (ATi). Les fréquences d'ADN RU-5, d'ADN viral total et d'ARN viral ont été quantifiées dans les cellules monocytaires triées ($CD14^+ CD16^-$, $CD14^+ CD16^+$ et $CD14^- CD16^+$) de (B) PBMC et (C) l'intestin. Chaque réaction a été effectuée en 2 à 4 réplicats de puits et les valeurs médianes ont été calculées. Chaque symbole représente un individu ($n=6$). Dans certains cas, le nombre restreint de cellules n'a pas permis de trier trois sous-populations de monocytes ou de quantifier l'ADN RU-5, l'ADN et l'ARN du VIS. Nous avons donc privilégié la quantification de l'ADN viral. Concernant l'intestin, les quantifications ont été réalisées dans les populations $CD14^+$ et $CD14^-$ uniquement. Les résultats sont exprimés en copies par 10^6 cellules. Le test de Mann-Whitney a été effectué, * indique $p < 0,05$; **, $p < 0,01$ et ***, $p < 0,001$.

4.3.3 Cibles préférentielles à l'arrêt du traitement

Sur la Figure 18, les résultats de quantification d'ADN viral total dans les LT CD4 et les cellules myéloïdes issus du sang (carré) et des compartiments intestinaux (rond) ont été représentés sur le même graphique en fonction du délai ATi. Les résultats concernant les populations 14^+16^- et 14^+16^+ des PBMC ont été compilés dans le graphique 14^+ pour faciliter la présentation visuelle.

Comme il a été décrit précédemment, le rebond viral concerne tous les singes sans exception. Pour autant, nous observons deux individus R110804 (euthanasié à J15 ATi) et 131878R (euthanasié à J28 ATi) pour lesquels nous n'avons pas détecté d'ADN viral, ni dans les LT CD4, ni dans les cellules myéloïdes.

Parallèlement, pour les individus chez qui nous observons de l'ADN viral à chaque jour d'euthanasie, nous observons que celui-ci est 100 fois plus élevé dans les lymphocytes T CD4 que dans les populations monocytaires 14^+ et 14^- . Ceci est d'autant plus flagrant lorsque les singes sont sacrifiés précocement après l'arrêt de TAR (#R110482, J10 ATi et 121888R, J12 ATi). En effet, nous observons 10^4 copies d'ADN viral/ 10^6 cellules dans les LT CD4, 10^2 copies d'ADN viral/ 10^6 cellules dans les cellules CD14⁻, et aucun ADN viral dans les cellules CD14⁺ (CD4⁺ J10, 14672 ± 13882 copies/ 10^6 cellules ; CD14⁻ J10, $47,9 \pm 81,26$ copies/ 10^6 cellules; CD14⁺ J10, 0 copies/ 10^6 cellules). Par conséquent, cela suggère que les LT CD4 sont plus susceptibles à l'infection et à la rétrotranscription, que ne le sont les cellules myéloïdes triées. Les monocytes ont donc tendance à s'infecter un peu plus tardivement à ATi.

En résumé de l'analyse post-TAR, les cellules monocytaires sont cibles du virus à l'arrêt du traitement, mais en fréquence moins élevée que les LT CD4, aussi bien dans le sang que dans les compartiments intestinaux. Ces cellules myéloïdes participent subséquentement à la re-dissémination virale lors de l'arrêt de traitements.

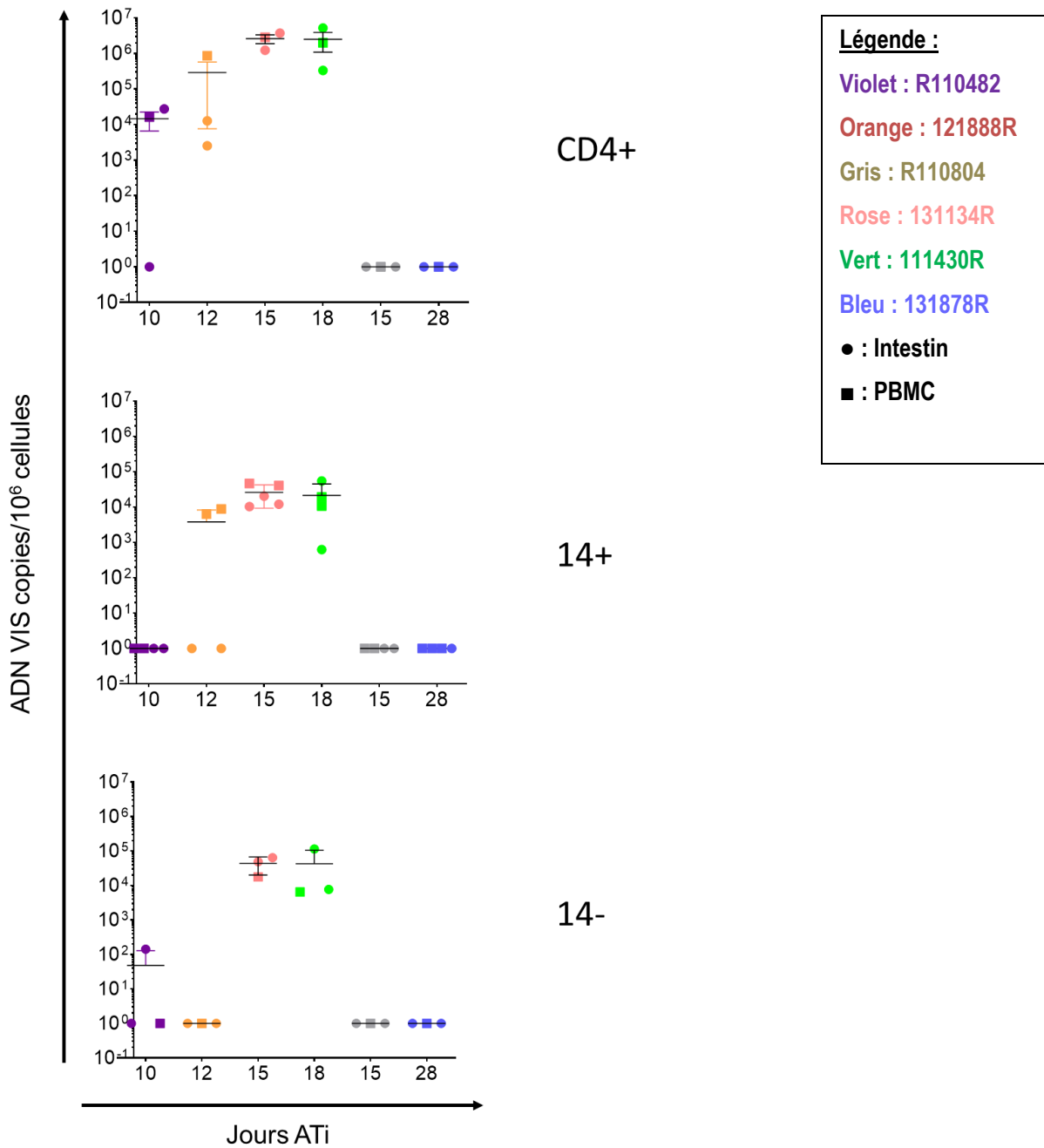


Figure 18. Cinétique de l'infection virale en fonction du temps après l'interruption de TAR (ATi). La population CD14⁺ inclue les populations CD14⁺ CD16⁻ et CD14⁺ CD16⁺. Les fréquences d'ADN viral ont été regroupés à chaque jour d'euthanasie post-TAR (jours 10, 12, 15, 15, 18, 28). Les symboles avec la même couleur représentent les échantillons d'un même individu. Symbole carré, PBMC. Symbole rond, intestin (jéjunum/iléon et colon).

Chapitre 5 : Discussion

Il est aujourd'hui établi que les cellules myéloïdes circulantes, que sont les monocytes/macrophages sont des cibles majeures du VIS [101]. La différence entre VIH-1 et VIS quant à l'infection des cellules myéloïdes est l'expression de la protéine virale Vpx chez le VIS qui facilite l'infection virale en ciblant SAMHD1, facteur de restriction de réplication virale [144]. Ainsi, la littérature suggère premièrement que le VIS serait susceptible d'infecter plus efficacement les cellules myéloïdes comparativement au VIH-1. Cependant, il a également été montré que le manque d'expression de Vpx (SIV lacking Vpx) n'a aucun effet significatif sur la présence d'ADN viral dans les cellules myéloïdes [133].

L'intestin, qui est un organe cible précoce du virus, est constamment repeuplé et reconstitué par ces cellules myéloïdes, issus des monoblastes de la moelle osseuse [105, 106]. Peu d'études nous renseignent sur le rôle des cellules myéloïdes de l'intestin lors de l'infection par le VIH. Ainsi, pour étudier leur contribution dans le réservoir du VIH, nous avons isolé dans notre étude *in vivo* des sous populations de lignée monocyttaire issus des compartiments intestinaux de RMs infectés naturellement par le VIS et sous TAR. En comparaison, les LT CD4 ont aussi été triés pour avoir matière de comparaison. Le matériel viral de ces cellules a ensuite été examiné. Dans cette présente étude, nous avons été capable de démontrer que les sous populations monocytaires CD14⁺, CD14⁺CD16⁺, et CD14⁻ de l'intestin ne sont pas des réservoirs du VIH sous traitement antirétroviral, mais participent à la dissémination du virus précocement après l'interruption de la TAR. En effet, tout comme pour une infection naturelle au VIS, les monocytes des macaques rhésus présentaient de l'ADN rétrotranscrit, de l'ADN viral total (ADN intégré et non intégré), ainsi que de l'ARN viral après l'interruption du traitement, bien qu'une éradication ait été observée sous TAR.

Au cours d'une infection naturelle par le VIS, la charge virale atteignant 10⁷ à 10⁸ copies/ml de plasma confirment ce qui a été précédemment inscrit dans la littérature [145, 146] . Ce résultat montre que l'infection *in vivo* est reproductible et que les résultats qui en découlent sont exploitables. D'une part, lors d'une infection naturelle, les résultats des hémogrammes réalisés sur plusieurs mois proposent que les monocytes sanguins aient tendance à augmenter. Au contraire, les LT CD4 subissent une déplétion massive à mesure

de l'infection tel qu'il a été proposé il y a plus de 25 ans [76]. Ces résultats apportent des connaissances immunologiques fondamentales supplémentaires sur la réponse immune lors de l'infection par le VIH, car peu d'études se sont intéressées à la dynamique de ces cellules myéloïdes sanguines au cours d'une infection naturelle. D'autre part, au niveau de l'intestin, les études de *Zachary D. Swan et al.* en 2015 et en 2017 suggèrent qu'il existe une accumulation persistante des macrophages CD163⁺ dans la muqueuse intestinale lors de l'infection progressive par le VIS. Ces macrophages ne parviendraient pas à phagocytter adéquatement les débris, ce qui pourrait potentiellement perpétuer leur recrutement [147, 148]. Ainsi, cette augmentation et cette accumulation monocyttaire pourrait suggérer que le virus serait capable d'établir un réservoir viral majeur, notamment dans l'intestin où la circulation de cellules myéloïdes est permanente. Or, nos travaux suggèrent sous thérapie que celles-ci ne le sont pas. Ainsi la présence d'ADN rétrotranscrit et d'ADN viral total dans les sous populations myéloïdes du sang périphérique et des compartiments intestinaux démontrent que le VIS est capable d'infecter significativement les monocytes du sang et des tissus intestinaux en accord avec d'autres études antérieures [101, 102, 127]. Notre étude souligne également le fait que l'infection s'établit autant dans les populations CD14⁺, que dans les populations CD16⁺. Bien qu'il y ait une différence d'infection entre VIS et VIH-1 du fait de l'interaction Vpx-SAMHD1 [144], il est tout de même intéressant de noter que ces résultats contredisent l'étude de *Philip J. Ellery et al.* (2007) [140] qui suggère que les lignées monocytaires CD16⁺ du sang sont plus permissives à l'infection et héberge de préférence le VIH-1 *in vivo*. D'ailleurs, dans le sang, les populations CD14⁺ sont plus susceptibles d'être infectées que la population CD14⁻ CD16⁺. En revanche dans l'intestin, la population CD14⁻ a tendance à être plus fréquemment infectée que la population CD14⁺.

De plus, grâce à la détection d'ARN viral cellulaire, nous montrons ici la capacité de ces monocytes intestinaux à répliquer le virus. A l'opposé et de façon intéressante, les études *in vitro* de *Shen R. et al.* (2009 et 2011) [149, 150] proposent que les monocytes intestinaux sont incapables de supporter une répllication virale active du fait de leur faible niveau d'expression des récepteurs CD4/CCR5 et de leur incapacité à activer la voie NF-KB qui est essentielle pour la transcription du VIH. Cependant, il ne peut être exclu que l'infection des macrophages *in vivo* soit indépendante de ces molécules, car d'autres facteurs de communication intercellulaires peuvent entrer en jeu tels que la trans-infection par les

cellules épithéliales [151], la formation de conjugués avec des cellules T [152] ou encore la formation de nanotubes (longues extensions de membranes reliant les cellules distantes) [153].

Dans notre étude, le haut niveau d'infection des LT CD4 démontre une fois de plus la forte susceptibilité de ces cellules à l'infection par le VIS/VIH.

L'administration d'une thérapie précoce hautement active au jour 4 diminue fortement la virémie tel qu'indique la littérature [154, 155], malgré des virémies ponctuelles pour quelques singes. Cette diminution de la virémie est associée à une stabilité du taux de LT CD4, de LT CD8 et de monocytes. Ces résultats peuvent nous laisser penser que le traitement antirétroviral précoce rétablit le système immunitaire à un niveau homéostatique. Concernant l'infection des cellules myéloïdes et des LT CD4 dans le sang, ni l'ADN rétrotranscrit, ni l'ADN viral total et ni l'ARN viral est détecté sous TAR. Ainsi, comme le suggère les études antérieures, cette étude confirme le fait que les molécules antirétrovirales sont capables d'éliminer efficacement le virus des cellules sanguines [156], même si certaines études montrent la présence de virus sous TAR. Ceci peut s'expliquer par le fait que nos singes ont été traités précocement après l'infection, alors que certaines études utilisent du matériel biologique issu de prélèvements sanguins de personnes traitées ayant été infectées par le VIH de manière chronique. Par conséquent, l'infection chronique laisse le temps au virus de se propager et d'établir des sanctuaires plus profonds. Dans les sous populations myéloïdes 14^+ et 14^- , et dans la population $CD4^+$ des compartiments intestinaux que sont le colon, le jéjunum et l'iléon, l'absence de rétrotranscrit indique que le virus n'est également pas capable de rétrotranscrire son ARN en ADN. De même, ceci expliquerait l'absence de détection d'ADN viral total et d'ARN viral dans ces populations myéloïdes. Ainsi, sous traitement antirétroviral, l'absence quasi complète de virus au sein des cellules cibles étudiées donne des preuves que les cellules monocytaires 14^+ et 14^- du sang et de l'intestin ne peuvent représenter des réservoirs viraux lors de l'infection. Ces résultats sont en parfait accord avec une étude récente publiée par *Cattin A. et al.* suggérant que le VIH-1 est rarement détecté dans le sang et les cellules myéloïdes du côlon au cours d'un traitement antirétroviral [157].

A l'interruption de thérapies antirétrovirales, la majorité des études concluent et confirment un rebond viral dès les premières semaines, tel que rapporté dans notre expérience. Cependant, bien que le rebond viral fait partie des observations majeures, les évènements immunologiques et virologiques sont à ce jour inconnus. Les processus de dissémination virale, la caractérisation des cibles précoces et la dynamique des cellules immunitaires n'ont pas été discutés. Par ailleurs, notre étude nous permet de mettre en exergue que le ratio CD4/CD8 reste stable les 30 premiers jours après l'arrêt du traitement, contrairement à ce qui a pu être observé au cours de l'infection naturelle. Qu'il s'agisse du VIH-1 ou du VIS, le rebond viral observé à la deuxième semaine [158] suggère que l'infection à l'arrêt du traitement correspondrait de nouveau à une primo-infection. Lors de celle-ci, il est connu que les LT CD4 sont plus susceptibles à mourir par apoptose [81] et qu'une déplétion massive s'effectue, dès les 30 premiers jours. Or, nous n'observons pas de déplétion précoce. Ces résultats indiquent que les évènements immunologiques diffèrent d'une primo-infection classique. Cependant, une étude ATi à long terme reste à réaliser afin de rendre compte de la dynamique des LT CD4 et LT CD8. Quant aux monocytes, la stabilité de leur pourcentage semble indiquer que l'interruption des traitements ne modifie pas leur dynamique dans le sang, tout comme pendant la période sous TAR. Nous pouvons supposer que les TAR jouent également un rôle majeur dans la dynamique des monocytes sanguins. Une fois de plus, une étude à long terme montrerait ce qu'il en est dans la durée après l'arrêt de la thérapie. De plus, concernant l'infection de ces cellules myéloïdes pendant la période ATi, dans le sang comme dans l'intestin, toutes les sous populations isolées présentent de l'ADN et de l'ARN viral en dépit de l'absence de détection virale sous TAR. Une fois de plus, notre étude prouve que le virus est capable de rétrotranscrire et d'intégrer le génome aussi bien dans les populations 14⁺ que 16⁺. La production virale des populations myéloïdes ne diffère également pas ce qui traduit la capacité de transcription complète des monocytes CD14⁺ comme les monocytes CD16⁺ après l'interruption de traitement. Bien que les études à l'arrêt de TAR ne se sont pas intéressées à la présence virale dans les populations myéloïdes pouvant participer à la pathogenèse du virus, il est connu qu'un arrêt de TAR augmente le niveau d'ADN intégré dans les PBMC [159].

A ce jour, aucune étude ne s'est intéressée à la dynamique d'infection virale dans les cellules lymphocytaires et myéloïdes en fonction du temps après l'interruption de traitements. L'intérêt de connaître la dynamique d'infection et des cibles préférentielles du virus à l'arrêt des traitements, est la mise en œuvre de stratégies inhibant l'infection de ces cellules, prévenant ainsi la dissémination virale. Ici, nous donnons la preuve que les cellules monocytaires de l'intestin et du sang sont des cibles secondaires du virus, alors que les LT CD4 de ces mêmes organes sont des cibles préférentielles, infectées plus précocement, et de manière plus importante (100 fois plus) à l'arrêt de traitement. Ceci renforce l'hypothèse que les cellules myéloïdes ne sont pas des réservoirs viraux dans le sang et dans l'intestin. De plus, même si tous les singes présentent un rebond viral, l'absence de virus dans les LT CD4 et les monocytes des deux singes à J15 et à J28 laisse suggérer que le rebond viral provient d'autres organes profonds, et non pas du sang et de l'intestin. En effet, après l'interruption de la TAR, d'autres cellules cibles issues d'autres organes seraient capables de s'activer, de produire du virus et de le disséminer via l'infection des LT CD4⁺, puis des sous populations de monocytes du colon, du jéjunum et l'iléon. Il est connu que la rate repeuple les compartiments intestinaux de cellules lymphocytaires éduquées et de cellules myéloïdes particulièrement activées [105, 106]. Les ganglions mésentériques comportent également des cellules activées qui peuvent être cibles du VIH/VIS. Ces organes sont essentiels car ils représentent un pool leucocytaire important et permettent la genèse de cellules effectrices qui patrouillent dans la lamina propria de l'intestin.

Sachant que les lymphocytes T CD4 et les cellules monocytaires des compartiments intestinaux et du sang ne sont pas à l'origine du rebond viral, cela laisse supposer que des organes tels que les ganglions mésentériques pourraient représenter une source de dissémination virale majeure à l'origine du rebond viral.

Les limites de mon étude concernent principalement le nombre limité de cellules récupérées, notamment dans les tissus intestinaux, pour lesquels certains RMs n'ont pas été testés dans toutes les conditions. En définitive, l'étude des réservoirs du VIS chez les macaques rhésus représentent un modèle pertinent dans la compréhension de l'établissement précoce des réservoirs viraux chez les patients séropositifs au VIH.

Chapitre 6 : Conclusion et perspectives

En conclusion, mes travaux ont mis en évidence que lors d'une infection naturelle par le VIS, le pool des cellules monocytaires (CD14⁺ CD16⁻, CD14⁺ CD16⁺, et CD14⁻ CD16⁺) infectées est aussi élevé dans le sang que dans le colon, le jéjunum et l'iléon.

En deuxième lieu, mes résultats ont mis en exergue que la thérapie antirétrovirale contrôle efficacement l'infection virale des monocytes dans le sang et dans l'intestin. Par conséquent, ceci indique que les cellules de la lignée monocytaire qui résident dans les compartiments intestinaux, à courtes demi-vie, ne peuvent donc être réservoir viral du VIS sous thérapie antirétrovirale. Cette étude permet d'exclure un rôle majeur des cellules monocytaires dans la persistance virale sous traitement.

Par ailleurs, le rebond viral observé après l'interruption du traitement est associé à l'étendue de l'infection des cellules monocytaires du sang et de l'intestin. Ainsi, ces analyses soulignent le fait que les cellules monocytaires à courte demi-vie du sang et de l'intestin contribuent plutôt à la dissémination virale une fois que la TAR est interrompu.

En perspective, l'analyse d'autres organes profonds, et d'autres types cellulaires myéloïdes permettraient d'évaluer davantage la contribution des cellules myéloïdes dans le rebond viral. La rate et les ganglions mésentériques qui drainent le tube digestif pourraient représenter des organes intéressants car l'activité immunitaire dans ces compartiments est hautement active. D'autre part, l'étude des cellules myéloïdes, à longue demi-vie, non issus de la moelle osseuse mais du sac vitellin, serait une voie de recherche dans le contexte du réservoir du VIH. Le cerveau, le foie ou encore le poumon seraient de bons organes candidats, en raison de leur quantité de cellules myéloïdes résidents.

D'un point de vue thérapeutique, en vue des résistances actuellement observables, cette étude constituerait un appui sur la mise au point de nouvelles stratégies thérapeutiques se basant sur la protection des cellules myéloïdes afin de prévenir la production et la dissémination virale.

Bibliographie

1. Hahn, B.H., et al., *Molecular cloning and characterization of the HTLV-III virus associated with AIDS*. Nature, 1984. **312**(5990): p. 166-9.
2. Janeway CA Jr, T.P., Walport M, et al. , *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease*. 2001., Garland Science: New York.
3. Barre-Sinoussi, F., A.L. Ross, and J.F. Delfraissy, *Past, present and future: 30 years of HIV research*. Nat Rev Microbiol, 2013. **11**(12): p. 877-83.
4. Hemelaar, J., *The origin and diversity of the HIV-1 pandemic*. Trends Mol Med, 2012. **18**(3): p. 182-92.
5. Stillwaggon, E., *HIV Transmission in Latin America: Comparison with Africa and Policy Implications - Stillwaggon - 2000 - South African Journal of Economics - Wiley Online Library*. 2018.
6. Sharp, P.M. and B.H. Hahn, *Origins of HIV and the AIDS pandemic*. Cold Spring Harb Perspect Med, 2011. **1**(1): p. a006841.
7. Canada, A.d.l.s.p.d., *Résumé : Estimations de l'incidence et de la prévalence du VIH, et des progrès réalisés par le Canada en ce qui concerne les cibles 90-90-90 pour le VIH, 2016 - Canada.ca*. 2018.
8. WHO. *OMS | 10 faits sur le VIH/sida*. WHO 2017 2017-12-01 15:27:25; Available from: <http://www.who.int/features/factfiles/hiv/fr/>.
9. Tsafack Temah, C., *Les déterminants de l'épidémie du VIH/SIDA en Afrique subsaharienne*. Revue d'économie du développement, 2009. **17**(1): p. 73-106.
10. OMS. *Global Health Observatory (GHO) data*. 2019; Available from: <https://www.who.int/gho/hiv/en/>.
11. Laboratory, N.R.C.C.o.H.B.S.i.t., *Recommendations for Prevention of HIV Transmission in Health-Care Settings*. 1989, National Academies Press (US).
12. Lehman, D.A. and C. Farquhar, *Biological mechanisms of vertical human immunodeficiency virus (HIV-1) transmission*. Rev Med Virol, 2007. **17**(6): p. 381-403.
13. Unaid. *UNAIDS Fact Sheet on differences in HIV spread in African cities*. 2018; Available from: http://data.unaids.org/publications/irc-pub03/lusaka99_en.html.
14. Stillwaggon, E., *HIV Transmission in Latin America: Comparison with Africa and Policy Implications - Stillwaggon - 2000 - South African Journal of Economics - Wiley Online Library*. 2000.

15. René, B., *HIV/AIDS : Does it increase or decrease growth in Africa?* AIDS Campaign Team. World Bank, Washington, D.C, 2000.
16. Cohen, M.S., et al., *The spread, treatment, and prevention of HIV-1: evolution of a global pandemic.* J Clin Invest, 2008. **118**(4): p. 1244-54.
17. Liu, R., et al., *Homozygous defect in HIV-1 coreceptor accounts for resistance of some multiply-exposed individuals to HIV-1 infection.* Cell, 1996. **86**(3): p. 367-77.
18. Donoval, B.A., et al., *HIV-1 target cells in foreskins of African men with varying histories of sexually transmitted infections.* Am J Clin Pathol, 2006. **125**(3): p. 386-91.
19. de Vincenzi, I., *Triple antiretroviral compared with zidovudine and single-dose nevirapine prophylaxis during pregnancy and breastfeeding for prevention of mother-to-child transmission of HIV-1 (Kesho Bora study): a randomised controlled trial.* Lancet Infect Dis, 2011. **11**(3): p. 171-80.
20. Chahroudi, A., et al., *Natural SIV Hosts: Showing AIDS the Door.* Science (New York, N.Y.), 2012. **335**(6073): p. 10.1126/science.1217550.
21. Greenwood, E.J., et al., *Simian Immunodeficiency Virus Infection of Chimpanzees (Pan troglodytes) Shares Features of Both Pathogenic and Non-pathogenic Lentiviral Infections.* PLoS Pathog, 2015. **11**(9): p. e1005146.
22. London, W.T., et al., *Experimental transmission of simian acquired immunodeficiency syndrome (SAIDS) and Kaposi-like skin lesions.* Lancet, 1983. **2**(8355): p. 869-73.
23. Letvin, N.L., et al., *Induction of AIDS-like disease in macaque monkeys with T-cell tropic retrovirus STLV-III.* Science, 1985. **230**(4721): p. 71-3.
24. Gardner, M.B. and P.A. Luciw, *Macaque models of human infectious disease.* Ilar j, 2008. **49**(2): p. 220-55.
25. 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), 2008. **181**(12): p. 8613-8623.
26. Huet, T., et al., *Genetic organization of a chimpanzee lentivirus related to HIV-1.* Nature, 1990. **345**(6273): p. 356-9.
27. Desrosiers, A.S.F. and Rc. *Pathogenesis of HIV and SIV.* [Text] 1997 1997; Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>.
28. German Advisory Committee Blood (Arbeitskreis Blut), S.A.o.P.T.b.B., *Human Immunodeficiency Virus (HIV).* Transfus Med Hemother, 2016. **43**(3): p. 203-22.

29. Turner, B.G. and M.F. Summers, *Structural biology of HIV*. J Mol Biol, 1999. **285**(1): p. 1-32.
30. Arthur, L.O., et al., *Cellular proteins bound to immunodeficiency viruses: implications for pathogenesis and vaccines*. Science, 1992. **258**(5090): p. 1935-8.
31. Niedrig, M., et al., *Inhibition of infectious human immunodeficiency virus type 1 particle formation by Gag protein-derived peptides*. J Gen Virol, 1994. **75** (Pt 6): p. 1469-74.
32. *Human Immunodeficiency Virus (HIV)*. Transfus Med Hemother, 2016. **43**(3): p. 203-22.
33. Robinson, H.L., *New hope for an AIDS vaccine*. Nat Rev Immunol, 2002. **2**(4): p. 239-50.
34. Frankel, A.D. and J.A. Young, *HIV-1: fifteen proteins and an RNA*. Annu Rev Biochem, 1998. **67**: p. 1-25.
35. Watts, J.M., et al., *Architecture and secondary structure of an entire HIV-1 RNA genome*. Nature, 2009. **460**(7256): p. 711-6.
36. Planelles, V., *Restricted access to myeloid cells explained*. Viruses, 2011. **3**(9): p. 1624-33.
37. Vicenzi, E. and G. Poli, *Novel factors interfering with human immunodeficiency virus-type 1 replication in vivo and in vitro*. Tissue Antigens, 2013. **81**(2): p. 61-71.
38. Hofmann, H., et al., *The Vpx lentiviral accessory protein targets SAMHD1 for degradation in the nucleus*. J Virol, 2012. **86**(23): p. 12552-60.
39. Beer Brigitte E., E.B., Paul M Sharp and Vanessa M Hirsch, *Diversity and Evolution of Primate Lentiviruses*. 2000.
40. Li, G. and E. De Clercq, *HIV Genome-Wide Protein Associations: a Review of 30 Years of Research*. Microbiology and Molecular Biology Reviews : MMBR, 2016. **80**(3): p. 679-731.
41. Chauhan, A., et al., *Endocytosis-mediated HIV-1 entry and its significance in the elusive behavior of the virus in astrocytes*. Virology, 2014. **456-457**: p. 1-19.
42. Cohen, T., et al., *The prevalence and drug sensitivity of tuberculosis among patients dying in hospital in KwaZulu-Natal, South Africa: a postmortem study*. PLoS Med, 2010. **7**(6): p. e1000296.
43. Wilen, C.B., J.C. Tilton, and R.W. Doms, *HIV: Cell Binding and Entry*. Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine, 2012. **2**(8): p. a006866.

44. Simmons, G., et al., *Co-receptor use by HIV and inhibition of HIV infection by chemokine receptor ligands*. Immunol Rev, 2000. **177**: p. 112-26.
45. Freed, E.O., *HIV-1 replication*. Somat Cell Mol Genet, 2001. **26**(1-6): p. 13-33.
46. Dharan, A., et al., *KIF5B and Nup358 Cooperatively Mediate the Nuclear Import of HIV-1 during Infection*. PLoS Pathog, 2016. **12**(6): p. e1005700.
47. Iglesias, C., et al., *Residual HIV-1 DNA Flap-independent nuclear import of cPPT/CTS double mutant viruses does not support spreading infection*. Retrovirology, 2011. **8**: p. 92.
48. Ao, Z., et al., *Importin alpha3 interacts with HIV-1 integrase and contributes to HIV-1 nuclear import and replication*. J Virol, 2010. **84**(17): p. 8650-63.
49. Schroder, A.R., et al., *HIV-1 integration in the human genome favors active genes and local hotspots*. Cell, 2002. **110**(4): p. 521-9.
50. Craigie, R. and F.D. Bushman, *HIV DNA Integration*. Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine, 2012. **2**(7): p. a006890.
51. Brady, T., et al., *HIV integration site distributions in resting and activated CD4(+) T cells infected in culture*. AIDS (London, England), 2009. **23**(12): p. 1461-1471.
52. Stevenson, M., et al., *HIV-1 replication is controlled at the level of T cell activation and proviral integration*. Embo j, 1990. **9**(5): p. 1551-60.
53. Simon, V., D.D. Ho, and Q.A. Karim, *HIV/AIDS epidemiology, pathogenesis, prevention, and treatment*. Lancet, 2006. **368**(9534): p. 489-504.
54. Freed, E.O., *HIV-1 gag proteins: diverse functions in the virus life cycle*. Virology, 1998. **251**(1): p. 1-15.
55. Gottlinger, H.G., et al., *Effect of mutations affecting the p6 gag protein on human immunodeficiency virus particle release*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(8): p. 3195-9.
56. Yeager, M., et al., *Supramolecular organization of immature and mature murine leukemia virus revealed by electron cryo-microscopy: implications for retroviral assembly mechanisms*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(13): p. 7299-304.
57. Waheed, A.A. and E.O. Freed, *HIV type 1 Gag as a target for antiviral therapy*. AIDS Res Hum Retroviruses, 2012. **28**(1): p. 54-75.
58. Maartens, G., C. Celum, and S.R. Lewin, *HIV infection: epidemiology, pathogenesis, treatment, and prevention*. Lancet, 2014. **384**(9939): p. 258-71.
59. Monceaux, V., et al., *Extensive apoptosis in lymphoid organs during primary SIV infection predicts rapid progression towards AIDS*. Aids, 2003. **17**(11): p. 1585-96.

60. Hoenigl, M., et al., *Signs or Symptoms of Acute HIV Infection in a Cohort Undergoing Community-Based Screening*. Emerg Infect Dis, 2016. **22**(3): p. 532-4.
61. Moir, S., T.W. Chun, and A.S. Fauci, *Pathogenic mechanisms of HIV disease*. Annu Rev Pathol, 2011. **6**: p. 223-48.
62. Scutari, R., et al., *The Role of HIV Infection in Neurologic Injury*. Brain Sci, 2017. **7**(4).
63. Gonzalez-Scarano, F. and J. Martin-Garcia, *The neuropathogenesis of AIDS*. Nat Rev Immunol, 2005. **5**(1): p. 69-81.
64. Mehandru, S., et al., *Primary HIV-1 infection is associated with preferential depletion of CD4+ T lymphocytes from effector sites in the gastrointestinal tract*. J Exp Med, 2004. **200**(6): p. 761-70.
65. Macal, M., et al., *Effective CD4+ T-cell restoration in gut-associated lymphoid tissue of HIV-infected patients is associated with enhanced Th17 cells and polyfunctional HIV-specific T-cell responses*. Mucosal Immunol, 2008. **1**(6): p. 475-88.
66. Brenchley, J.M., et al., *Microbial translocation is a cause of systemic immune activation in chronic HIV infection*. Nat Med, 2006. **12**(12): p. 1365-71.
67. Younas, M., et al., *Immune activation in the course of HIV-1 infection: Causes, phenotypes and persistence under therapy*. HIV Med, 2016. **17**(2): p. 89-105.
68. Pasquereau, S., A. Kumar, and G. Herbein, *Targeting TNF and TNF Receptor Pathway in HIV-1 Infection: from Immune Activation to Viral Reservoirs*. Viruses, 2017. **9**(4).
69. Monceaux, V., et al., *CD8+ T cell dynamics during primary simian immunodeficiency virus infection in macaques: relationship of effector cell differentiation with the extent of viral replication*. J Immunol, 2005. **174**(11): p. 6898-908.
70. Cumont, M.C., et al., *TGF-beta in intestinal lymphoid organs contributes to the death of armed effector CD8 T cells and is associated with the absence of virus containment in rhesus macaques infected with the simian immunodeficiency virus*. Cell Death Differ, 2007. **14**(10): p. 1747-58.
71. Moir, S. and A.S. Fauci, *B-cell responses to HIV infection*. Immunol Rev, 2017. **275**(1): p. 33-48.
72. Monceaux, V., et al., *Distinct cycling CD4(+)- and CD8(+)-T-cell profiles during the asymptomatic phase of simian immunodeficiency virus SIVmac251 infection in rhesus macaques*. Journal of virology, 2003. **77**(18): p. 10047-10059.

73. Mocroft, A. and J.D. Lundgren, *Starting highly active antiretroviral therapy: why, when and response to HAART*. J Antimicrob Chemother, 2004. **54**(1): p. 10-3.
74. El-Atrouni, W., E. Berbari, and Z. Temesgen, *HIV-associated opportunistic infections. Bacterial infections*. J Med Liban, 2006. **54**(2): p. 80-3.
75. Estaquier, J., et al., *Fas-mediated apoptosis of CD4+ and CD8+ T cells from human immunodeficiency virus-infected persons: differential in vitro preventive effect of cytokines and protease antagonists*. Blood, 1996. **87**(12): p. 4959-66.
76. Ameisen, J.C., J. Estaquier, and T. Idziorek, *From AIDS to parasite infection: pathogen-mediated subversion of programmed cell death as a mechanism for immune dysregulation*. Immunol Rev, 1994. **142**: p. 9-51.
77. Pandrea, I., et al., *Simian immunodeficiency viruses replication dynamics in African non-human primate hosts: common patterns and species-specific differences*. J Med Primatol, 2006. **35**(4-5): p. 194-201.
78. Monceaux, V., et al., *CD4+ CCR5+ T-cell dynamics during simian immunodeficiency virus infection of Chinese rhesus macaques*. J Virol, 2007. **81**(24): p. 13865-75.
79. Bosinger, S.E., et al., *Global genomic analysis reveals rapid control of a robust innate response in SIV-infected sooty mangabeys*. J Clin Invest, 2009. **119**(12): p. 3556-72.
80. Silvestri, G., et al., *Nonpathogenic SIV infection of sooty mangabeys is characterized by limited bystander immunopathology despite chronic high-level viremia*. Immunity, 2003. **18**(3): p. 441-52.
81. Estaquier, J., et al., *Programmed cell death and AIDS: significance of T-cell apoptosis in pathogenic and nonpathogenic primate lentiviral infections*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(20): p. 9431-5.
82. Brenchley, J.M., et al., *Differential Th17 CD4 T-cell depletion in pathogenic and nonpathogenic lentiviral infections*. Blood, 2008. **112**(7): p. 2826-35.
83. Paiardini, M., et al., *Bone marrow-based homeostatic proliferation of mature T cells in nonhuman primates: implications for AIDS pathogenesis*. Blood, 2009. **113**(3): p. 612-21.
84. Apetrei, C., et al., *Immunovirological analyses of chronically simian immunodeficiency virus SIVmnd-1- and SIVmnd-2-infected mandrills (Mandrillus sphinx)*. J Virol, 2011. **85**(24): p. 13077-87.
85. Chakrabarti, L.A., et al., *Normal T-Cell Turnover in Sooty Mangabeys Harboring Active Simian Immunodeficiency Virus Infection*. Journal of Virology, 2000. **74**(3): p. 1209-1223.

86. Estes, J.D., et al., *Simian immunodeficiency virus-induced lymphatic tissue fibrosis is mediated by transforming growth factor beta 1-positive regulatory T cells and begins in early infection*. J Infect Dis, 2007. **195**(4): p. 551-61.
87. Paiardini, M., et al., *Low levels of SIV infection in sooty mangabey central memory CD4(+) T cells are associated with limited CCR5 expression*. Nat Med, 2011. **17**(7): p. 830-6.
88. VandeWoude, S. and C. Apetrei, *Going wild: lessons from naturally occurring T-lymphotropic lentiviruses*. Clin Microbiol Rev, 2006. **19**(4): p. 728-62.
89. Bhatti, A.B., M. Usman, and V. Kandi, *Current Scenario of HIV/AIDS, Treatment Options, and Major Challenges with Compliance to Antiretroviral Therapy*. Cureus, 2016. **8**(3): p. e515.
90. Administration, U.S.F. and Drug. *HIV/AIDS Treatment - Antiretroviral drugs used in the treatment of HIV infection*. [WebContent] 2018; Available from: <https://www.fda.gov/forpatients/illness/hivaids/treatment/ucm118915.htm>.
91. Arts, E.J. and D.J. Hazuda, *HIV-1 Antiretroviral Drug Therapy*. Cold Spring Harb Perspect Med, 2012. **2**(4).
92. Pan, X., et al., *Restrictions to HIV-1 replication in resting CD4(+) T lymphocytes*. Cell Research, 2013. **23**(7): p. 876-885.
93. Chavez, L., V. Calvanese, and E. Verdin, *HIV Latency Is Established Directly and Early in Both Resting and Activated Primary CD4 T Cells*. PLoS Pathogens, 2015. **11**(6): p. e1004955.
94. Spear, M., J. Guo, and Y. Wu, *The trinity of the cortical actin in the initiation of HIV-1 infection*. Retrovirology, 2012. **9**: p. 45-45.
95. Chomont, N., et al., *HIV reservoir size and persistence are driven by T cell survival and homeostatic proliferation*. Nat Med, 2009. **15**(8): p. 893-900.
96. Whitney, J.B., et al., *Rapid Seeding of the Viral Reservoir Prior to SIV Viremia in Rhesus Monkeys*. Nature, 2014. **512**(7512): p. 74-7.
97. Borducchi, E.N., et al., *Ad26/MVA Therapeutic Vaccination with TLR7 Stimulation in SIV-Infected Rhesus Monkeys*. Nature, 2016. **540**(7632): p. 284-7.
98. Miles, B. and E. Connick, *T(FH) in HIV Latency and as Sources of Replication Competent Virus*. Trends Microbiol, 2016. **24**(5): p. 338-44.
99. Moukambi, F., et al., *Early Loss of Splenic Tfh Cells in SIV-Infected Rhesus Macaques*. PLoS Pathogens, 2015. **11**(12): p. e1005287.

100. Luster, A.D., R. Alon, and U.H. von Andrian, *Immune cell migration in inflammation: present and future therapeutic targets*. Nat Immunol, 2005. **6**(12): p. 1182-90.
101. DiNapoli, S.R., et al., *Tissue-resident macrophages can contain replication-competent virus in antiretroviral-naive, SIV-infected Asian macaques*. JCI insight, 2017. **2**(4): p. e91214-e91214.
102. Li, Y., et al., *SIV Infection of Lung Macrophages*. PloS one, 2015. **10**(5): p. e0125500-e0125500.
103. Manches, O., D. Frleta, and N. Bhardwaj, *Dendritic cells in progression and pathology of HIV infection*. Trends Immunol, 2014. **35**(3): p. 114-22.
104. Swirski, F.K., et al., *Identification of splenic reservoir monocytes and their deployment to inflammatory sites*. Science, 2009. **325**(5940): p. 612-6.
105. Bain, C.C., et al., *Constant replenishment from circulating monocytes maintains the macrophage pool in the intestine of adult mice*. Nat Immunol, 2014. **15**(10): p. 929-937.
106. Bain, C.C., et al., *Resident and pro-inflammatory macrophages in the colon represent alternative context-dependent fates of the same Ly6Chi monocyte precursors*. Mucosal Immunol, 2013. **6**(3): p. 498-510.
107. Lee, S.H., P.M. Starkey, and S. Gordon, *Quantitative analysis of total macrophage content in adult mouse tissues. Immunochemical studies with monoclonal antibody F4/80*. J Exp Med, 1985. **161**(3): p. 475-89.
108. Gordon, S. and P.R. Taylor, *Monocyte and macrophage heterogeneity*. Nat Rev Immunol, 2005. **5**(12): p. 953-64.
109. Grage-Griebenow, E., H.D. Flad, and M. Ernst, *Heterogeneity of human peripheral blood monocyte subsets*. J Leukoc Biol, 2001. **69**(1): p. 11-20.
110. Ziegler-Heitbrock, L., et al., *Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood*. Blood, 2010. **116**(16): p. e74-80.
111. Auffray, C., M.H. Sieweke, and F. Geissmann, *Blood monocytes: development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells*. Annu Rev Immunol, 2009. **27**: p. 669-92.
112. Geissmann, F., S. Jung, and D.R. Littman, *Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties*. Immunity, 2003. **19**(1): p. 71-82.
113. Ancuta, P., et al., *Fractalkine Preferentially Mediates Arrest and Migration of CD16⁺ Monocytes*. The Journal of Experimental Medicine, 2003. **197**(12): p. 1701.

114. Yeap, W.H., et al., *CD16 is indispensable for antibody-dependent cellular cytotoxicity by human monocytes*. Scientific reports, 2016. **6**: p. 34310-34310.
115. Breton, G., [*Origin of human dendritic cell diversity*]. Med Sci (Paris), 2017. **33**(10): p. 820-822.
116. Chistiakov, D.A., et al., *Myeloid dendritic cells: Development, functions, and role in atherosclerotic inflammation*. Immunobiology, 2015. **220**(6): p. 833-44.
117. Collin, M. and V. Bigley, *Human dendritic cell subsets: an update*. Immunology, 2018. **154**(1): p. 3-20.
118. McKenna, K., A.-S. Beignon, and N. Bhardwaj, *Plasmacytoid Dendritic Cells: Linking Innate and Adaptive Immunity*. Journal of Virology, 2005. **79**(1): p. 17.
119. Paul, W.E., *Bridging innate and adaptive immunity*. Cell, 2011. **147**(6): p. 1212-5.
120. Durai, V. and Kenneth M. Murphy, *Functions of Murine Dendritic Cells*. Immunity, 2016. **45**(4): p. 719-736.
121. Wu, L. and V.N. KewalRamani, *Dendritic-cell interactions with HIV: infection and viral dissemination*. Nature reviews. Immunology, 2006. **6**(11): p. 859-868.
122. Gartner, S., et al., *The role of mononuclear phagocytes in HTLV-III/LAV infection*. Science, 1986. **233**(4760): p. 215-9.
123. McElrath, M.J., R.M. Steinman, and Z.A. Cohn, *Latent HIV-1 infection in enriched populations of blood monocytes and T cells from seropositive patients*. J Clin Invest, 1991. **87**(1): p. 27-30.
124. Collman, R., et al., *Infection of monocyte-derived macrophages with human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1). Monocyte-tropic and lymphocyte-tropic strains of HIV-1 show distinctive patterns of replication in a panel of cell types*. J Exp Med, 1989. **170**(4): p. 1149-63.
125. Folks, T.M., et al., *Cytokine-induced expression of HIV-1 in a chronically infected promonocyte cell line*. Science, 1987. **238**(4828): p. 800-2.
126. Gendelman, H.E., et al., *Efficient isolation and propagation of human immunodeficiency virus on recombinant colony-stimulating factor 1-treated monocytes*. J Exp Med, 1988. **167**(4): p. 1428-41.
127. Laforge, M., et al., *HIV/SIV infection primes monocytes and dendritic cells for apoptosis*. PLoS Pathog, 2011. **7**(6): p. e1002087.
128. Perno, C.F., et al., *Replication of human immunodeficiency virus in monocytes. Granulocyte/macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) potentiates viral production yet enhances the antiviral effect mediated by 3'-azido-2'3'*

- dideoxythymidine (AZT) and other dideoxynucleoside congeners of thymidine. J Exp Med, 1989. 169(3): p. 933-51.*
129. Weinberg, J.B., et al., *Productive human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) infection of nonproliferating human monocytes. J Exp Med, 1991. 174(6): p. 1477-82.*
 130. Triques, K. and M. Stevenson, *Characterization of Restrictions to Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection of Monocytes. Journal of Virology, 2004. 78(10): p. 5523.*
 131. Laguette, N., et al., *SAMHD1 is the dendritic- and myeloid-cell-specific HIV-1 restriction factor counteracted by Vpx. Nature, 2011. 474(7353): p. 654-657.*
 132. Fujita, M., et al., *SAMHD1-Dependent and -Independent Functions of HIV-2/SIV Vpx Protein. Frontiers in microbiology, 2012. 3: p. 297-297.*
 133. Calantone, N., et al., *Tissue myeloid cells in SIV-infected primates acquire viral DNA through phagocytosis of infected T cells. Immunity, 2014. 41(3): p. 493-502.*
 134. Zhu, T., et al., *Evidence for human immunodeficiency virus type 1 replication in vivo in CD14(+) monocytes and its potential role as a source of virus in patients on highly active antiretroviral therapy. J Virol, 2002. 76(2): p. 707-16.*
 135. Kim, W.K., et al., *Monocyte heterogeneity underlying phenotypic changes in monocytes according to SIV disease stage. J Leukoc Biol, 2010. 87(4): p. 557-67.*
 136. Patterson, B.K., et al., *Detection of HIV-RNA-positive monocytes in peripheral blood of HIV-positive patients by simultaneous flow cytometric analysis of intracellular HIV RNA and cellular immunophenotype. Cytometry, 1998. 31(4): p. 265-74.*
 137. Thieblemont, N., et al., *CD14^{low}CD16^{high}: a cytokine-producing monocyte subset which expands during human immunodeficiency virus infection. Eur J Immunol, 1995. 25(12): p. 3418-24.*
 138. Ancuta, P., et al., *CD16⁺ Monocyte-Derived Macrophages Activate Resting T Cells for HIV Infection by Producing CCR3 and CCR4 Ligands. The Journal of Immunology, 2006. 176(10): p. 5760.*
 139. Ancuta, P., et al., *CD16⁺ monocytes exposed to HIV promote highly efficient viral replication upon differentiation into macrophages and interaction with T cells. Virology, 2006. 344(2): p. 267-276.*
 140. Ellery, P.J., et al., *The CD16⁺ monocyte subset is more permissive to infection and preferentially harbors HIV-1 in vivo. J Immunol, 2007. 178(10): p. 6581-9.*

141. Micci, L., et al., *CD4 depletion in SIV-infected macaques results in macrophage and microglia infection with rapid turnover of infected cells*. PLoS pathogens, 2014. **10**(10): p. e1004467-e1004467.
142. Réu, P., et al., *The Lifespan and Turnover of Microglia in the Human Brain*. Cell reports, 2017. **20**(4): p. 779-784.
143. Low, W.S. and W.A.B. Wan Abas, *Benchtop technologies for circulating tumor cells separation based on biophysical properties*. BioMed research international, 2015. **2015**: p. 239362-239362.
144. Hrecka, K., et al., *Vpx relieves inhibition of HIV-1 infection of macrophages mediated by the SAMHD1 protein*. Nature, 2011. **474**(7353): p. 658-61.
145. Monceaux, V., et al., *CD4+ CCR5+ T-cell dynamics during simian immunodeficiency virus infection of Chinese rhesus macaques*. Journal of virology, 2007. **81**(24): p. 13865-13875.
146. Zhou, Y., et al., *SIV infection of rhesus macaques of Chinese origin: a suitable model for HIV infection in humans*. Retrovirology, 2013. **10**(1): p. 89.
147. Swan, Z.D., et al., *Persistent accumulation of gut macrophages with impaired phagocytic function correlates with SIV disease progression in macaques*. Eur J Immunol, 2017. **47**(11): p. 1925-1935.
148. Swan, Z.D., E.R. Wonderlich, and S.M. Barratt-Boyes, *Macrophage accumulation in gut mucosa differentiates AIDS from chronic SIV infection in rhesus macaques*. Eur J Immunol, 2016. **46**(2): p. 446-54.
149. Shen, R., et al., *Stromal down-regulation of macrophage CD4/CCR5 expression and NF-kappaB activation mediates HIV-1 non-permissiveness in intestinal macrophages*. PLoS Pathog, 2011. **7**(5): p. e1002060.
150. Shen, R., et al., *Macrophages in vaginal but not intestinal mucosa are monocyte-like and permissive to human immunodeficiency virus type 1 infection*. J Virol, 2009. **83**(7): p. 3258-67.
151. Martin, N. and Q. Sattentau, *Cell-to-cell HIV-1 spread and its implications for immune evasion*. Current Opinion in HIV and AIDS, 2009. **4**(2): p. 143-149.
152. Bracq, L., et al., *Mechanisms for Cell-to-Cell Transmission of HIV-1*. Frontiers in immunology, 2018. **9**: p. 260-260.
153. Hashimoto, M., et al., *Potential Role of the Formation of Tunneling Nanotubes in HIV-1 Spread in Macrophages*. J Immunol, 2016. **196**(4): p. 1832-41.

154. Mavigner, M., et al., *Simian Immunodeficiency Virus Persistence in Cellular and Anatomic Reservoirs in Antiretroviral Therapy-Suppressed Infant Rhesus Macaques*. J Virol, 2018. **92**(18).
155. Okoye, A.A., et al., *Early antiretroviral therapy limits SIV reservoir establishment to delay or prevent post-treatment viral rebound*. Nat Med, 2018. **24**(9): p. 1430-1440.
156. Cohen, M.S., et al., *Antiretroviral treatment of HIV-1 prevents transmission of HIV-1: where do we go from here?* Lancet (London, England), 2013. **382**(9903): p. 1515-1524.
157. Cattin, A., et al., *HIV-1 is rarely detected in blood and colon myeloid cells during viral-suppressive antiretroviral therapy*. Aids, 2019.
158. Colby, D.J., et al., *Rapid HIV RNA rebound after antiretroviral treatment interruption in persons durably suppressed in Fiebig I acute HIV infection*. Nat Med, 2018. **24**(7): p. 923-926.
159. Strongin, Z., et al., *Effect of Short-Term Antiretroviral Therapy Interruption on Levels of Integrated HIV DNA*. J Virol, 2018. **92**(12).