

Sur les pistes de l' éradication virale

Dr Laurence Morand-Joubert
3 février
Mont Saint-Michel





Sur les pistes de l' éradication

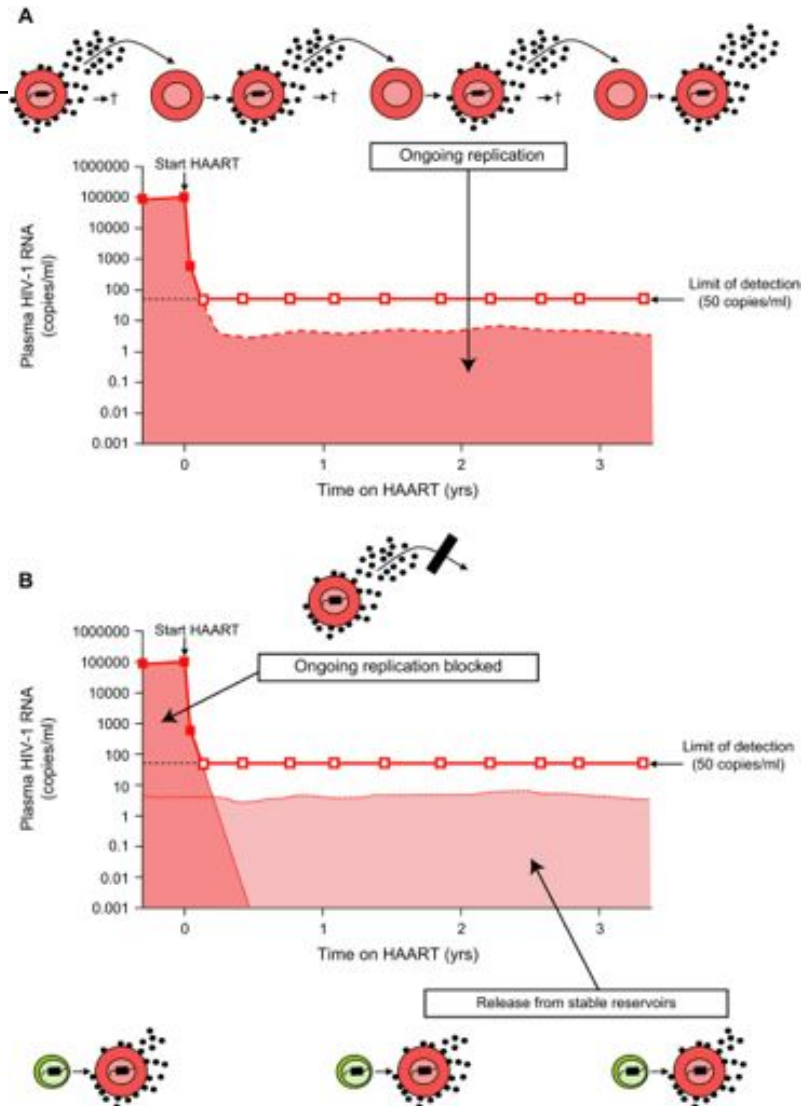
- ❑ Mécanismes cellulaires, viraux et immunologiques de la persistance virale
- ❑ Caractérisation des réservoirs cellulaires et tissulaires de la persistance virale chez un patient traité efficacement
- ❑ Origines de l' activation immune et de l' inflammation.
Conséquences sur la persistance virale
- ❑ Evaluation de la persistance virale
- ❑ Stratégies thérapeutiques d' éradication virale



Induction de la latence virale

- Modèle in vitro d'induction de la latence virale
 - Plusieurs chemokines qui se fixent sur les récepteurs CCR7 (CCL19), CXCR3 (CXCL9 et CXCL10) et CCR6 (CCL20) peuvent établir une latence virale dans les cellules infectées au repos
 - Elles facilitent l'intégration virale
 - Elles empêchent l'export des ARNm du noyau au cytoplasme
- Les cellules dendritiques peuvent induire également la latence des CD4 mémoires. Dans un modèle de coculture (cellules dendritiques avec LT CD4+), la latence dépend de l'expression de **428 gènes** cellulaires
 - Gènes perturbateurs du cycle cellulaire
 - Gènes supprimant l'activation NF-kB.

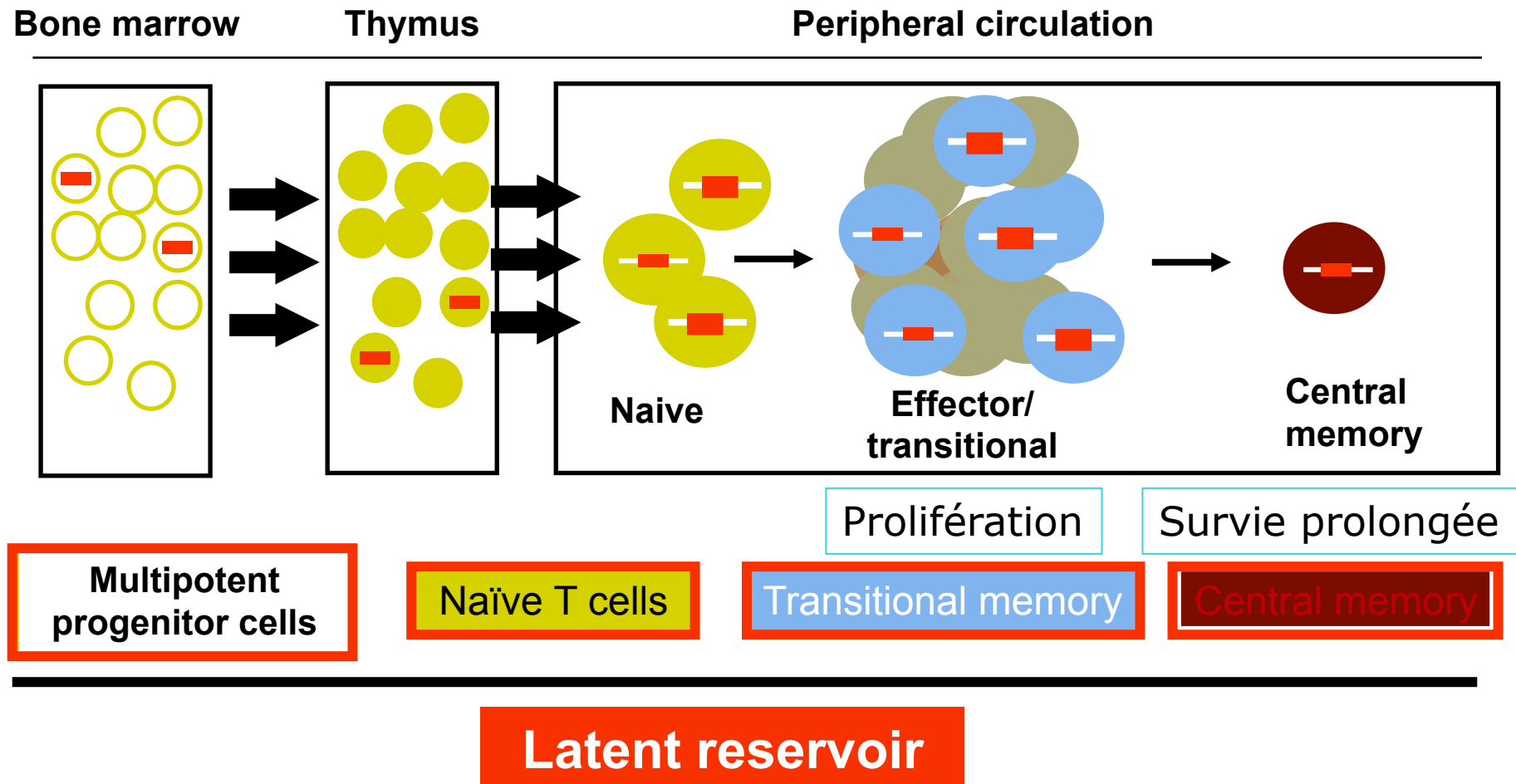
Origine de la virémie résiduelle



Réplication résiduelle

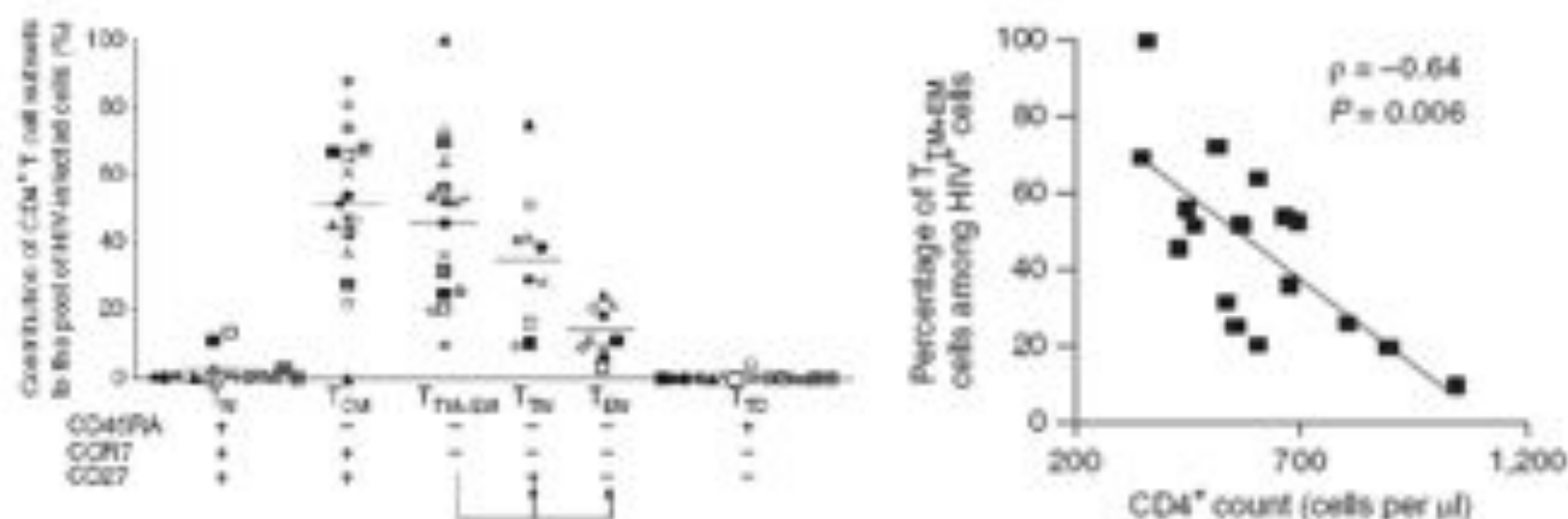
Survie des cellules T
Prolifération

Réplication résiduelle: Infection latente établie dans de nombreux LT



Chun et al., *Nature* 1997; 387:183; Finzi et al., *Science* 1997; 278:1295; Brooks et al., *Nat Med* 2001; 7:459 ;
Chomont et al., *Nat Med* 2009; 15: 893; Dai et al., *J Virol* 2009; 83(9):4528-37; Carter et al., *Nat Med* 2010; 16: 446

HIV reservoir size and persistence are driven by T cell survival and homeostatic proliferation



During HAART, a low CD4 predicts a higher frequency of infected cells and a shift in reservoir toward transitional and effector cells; this effect that may be due to IL-7 mediated T cell proliferation



Rôle des cytokines IL-7 et IL-15 dans la persistance virale

- Etude de l'effet de l'IL-7 et de l'IL-15 in vitro sur des LT CD4+ provenant de pts infectés traités et avirémiques
 - Augmentation de la survie cellulaire
 - Augmentation du réservoir (ADN viral) par prolifération dans le but de maintenir l'homéostasie (IL-7 > IL-15)
 - IL-7: prolifération des T_N et T_{CM}
 - IL-15: prolifération des T_{EM} et T_{TM}
 - Réactivation avec production virale (IL-15 > IL-7)
-
- ▶ **Utilisation de l'IL-15 dans la stratégie d'élimination du réservoir ?**



Caractérisation du réservoir latent

- Etude de 12 pts sous TT efficace (7 en primo-infection; 5 en infection chronique)
- Objectif: identifier les cellules infectées et celles en cours de réplication (sang, tube digestif, moelle)
- Etude de l'évolution virale par calcul de la distance génétique (séquençage d'un génome unique)
 - Pas d'infection des progéniteurs hématopoïétiques, des monocytes
 - Infection des cellules CD4 naïves et des cellules CD4 mémoires
 - Très faible évolution génétique entre le virus présent avant le TT et le virus retrouvé après plusieurs années de TT efficace dans le sang et le tissu lymphoïde du T digestif
- ▶ Les progéniteurs médullaires ne sont pas la source d'une infection virale persistante
- ▶ La persistance virale proviendrait de la prolifération cellulaire plutôt que d'une réplication active



Modèle des « Elite Controllers »

- ❑ Modèle de contrôle spontanée de la réplication virale: 1/300 pts
- ❑ Augmentation de la sensibilité des CD4 T naïves aux CD8 cytotoxiques (pas de modification des CD4 centrales mémoires ou effectrices mémoires)
- ❑ Pas de relation de cette augmentation de sensibilité avec le niveau d'activation ou d'apoptose
- ❑ Réservoir viral plus faible au niveau des CD4 T naïves
 - Cette augmentation de la sensibilité des CD4 T naïves aux CD8 cytotoxiques limite le réservoir viral ds ces cellules

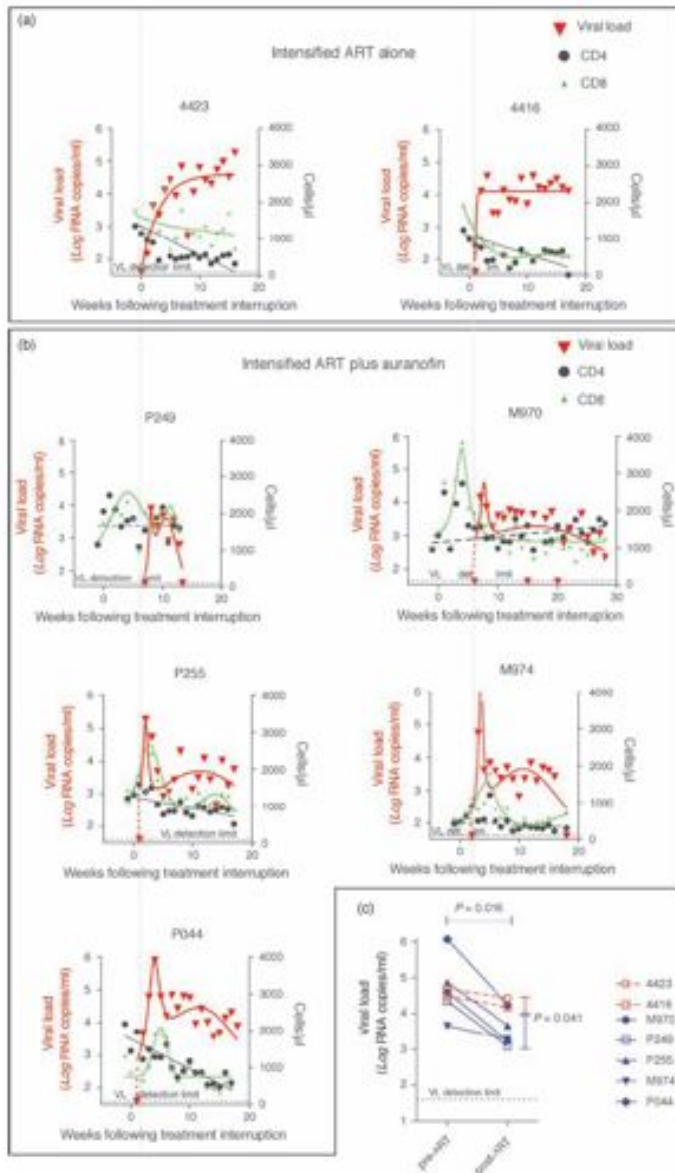
Effet du Maraviroc sur la réactivation

- Etude de l'effet du MVC sur la transcription virale après 10 jours de monothérapie et à 18 jours de l'arrêt du MVC chez 8 pts, R5 (n=6) et D/M (n=2)

Patient (Tropism)	NFkB activity (FC)			
	Activated CD4 T cell		Resting CD4 T cell	
	Day 10 (on MRV)	Day 28 (off MRV)	Day 10 (on MRV)	Day 28 (off MRV)
27 (R5)	5.3	0.2	7.6	10.4
28 (R5)	18.0	0.2	4.6	5.3
35 (R5)	0.0	0.6	4.6	1.2
29 (R5)	7.1	3.4	17.6	10.1
50 (D/M)	4.8	1.8	9.1	10.5

- Augmentation de l'activité NFkB dans les cellules CD4+ activées et au repos
- Persistance de l'effet dans les cellules au repos 18 jours après l'arrêt du MVC
 - ▶ Utilisation du MVC dans la stratégie d'élimination du réservoir ?

Effet des sels d'or dans l'éradication virale



- ❑ Sels d'or: Augmentation de l'apoptose et de la différenciation entraînant la mort des cellules mémoires
- ❑ Modèle SIVmac: 18 animaux traités par mégaHaart +/- sels d'or pendant 2 semaines
- ❑ Mort des cellules mémoires
- ❑ Diminution du réservoir viral dans le groupe tt par sel d'or
- ❑ Après l'interruption du tt, rebond de la CV retardé et niveau de l'état d'équilibre plus faible dans le groupe tt par sel d'or

Persistance virale

dans les compartiments lymphoïdes

- Etude de 12 pts; durée d'infection 5,8 ans; nadir des CD4 de 381/mm³, mise sous tt (TDF/FTC + ATV n=4 ou EFV n=1)
 - Excellente adhérence. Succès virologique pour tous.
 - Biopsies multiples de ganglions, de tissu lymphoïde du tube digestif à 1, 3 et 6 mois du tt
- Résultats pharmacologiques
 - TFV-DP : Concentration plus faible dans les ganglions
 - FTC-TP: Concentration plus faible dans les ganglions, Ileon, Rectum
 - EFV: Concentration plus faible dans les ganglions, Ileon, Rectum
- Résultats virologiques dans les tissus (hybridation in situ)
 - Présence de particules virales avec expression locale
 - Foyers persistants sous traitement, sur pls prélèvements
- ▶ Organes lymphoïdes
 - Concentration inadéquate, insuffisant pour inhiber la réplication virale
 - Réservoir majeur du VIH avec maintien d'une réplication virale de faible niveau



Evaluation de la réplication résiduelle ou de la persistance virale

- Marqueurs de substitution directs et indirects
 - Virémie résiduelle (ARN viral par mesure de la CV ultrasensible; seuil à 1 cp/ml)
 - Infection des cellules latentes
 - ADN intégré ou ADN total
 - ADN circulaire ou épisomal
 - ARNm intracellulaire (Transcription cellulaire)
 - Evolution des séquences virales par analyse phylogénétique
 - Activation immune et inflammation



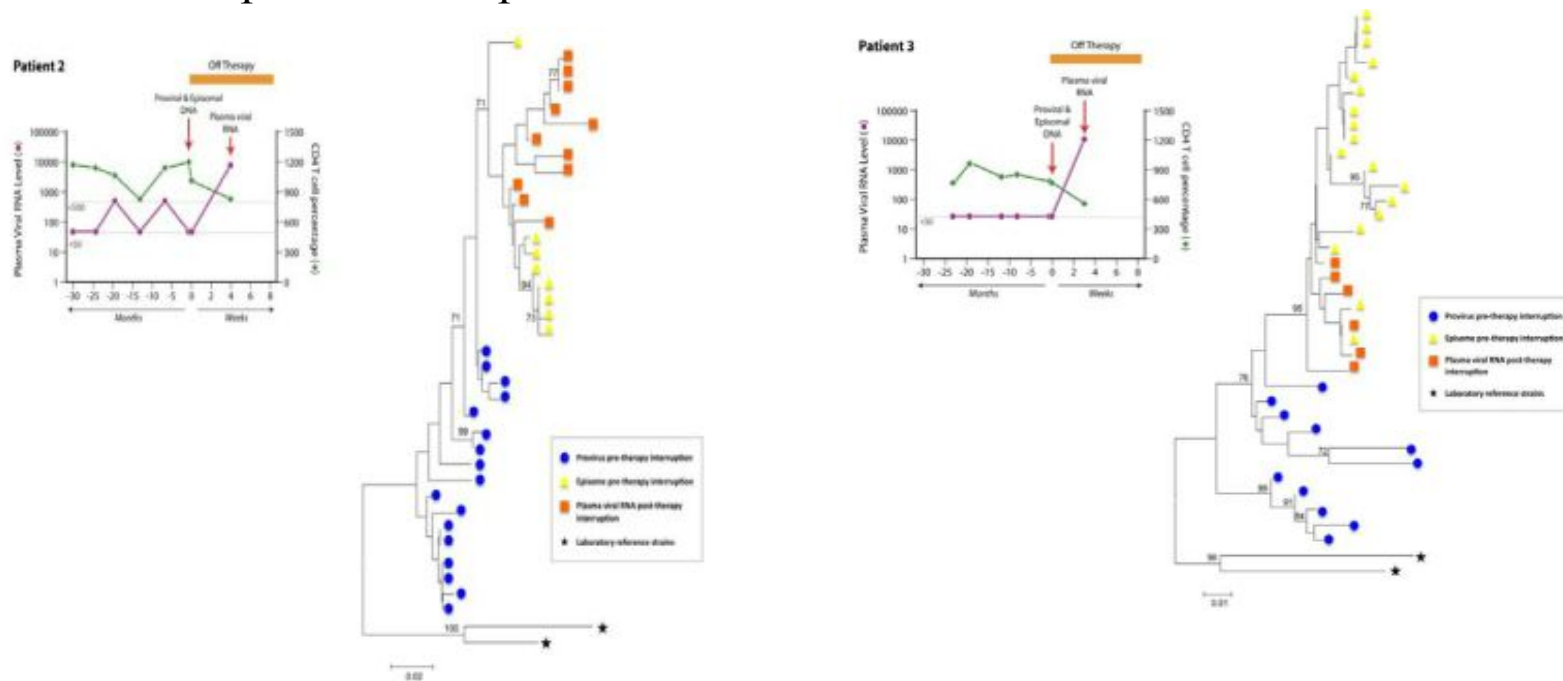
Signification de l' ADN total et des formes intermédiaires dans l' évaluation de la persistance virale

- Modèle des « Elite controllers »
 - Niveau similaire d' ADN total entre les EC et les pts traités et contrôlés
 - Niveau plus faible d' ADN intégré chez les EC
 - Par une réponse CTL plus efficace
 - Niveau plus élevé d' ADN épisomal chez les EC
 - Par blocage de l' intégration par l' immunité innée

- **La mesure de l' ADN total n' est pas un bon marqueur de substitution chez les EC**

Signification de l' ADN épisomal dans l' évaluation de la persistance virale

- ❑ Etude sur 6 pts sous TT efficace >20 mois, après une interruption de TT
- ❑ Comparaison par analyse phylogénétique des séquences env de l' ADN épisomal et de l' ADN intégré avt interruption avec les séquences de l' ARN viral à 3, 4, 8 semaines après l' interruption



Stratégies d'éradication

□ Avant: IL-2, Ac Anti-CD3, Acide Valproïque

□ Maintenant:

- Intensification
- IL-7
- SAHA
- Anticorps anti-PD-1
- Thérapie génique (CCR5, CXCR4)

Cure-Related Clinical Trials Recruiting Patients

Principal Investigators	Sponsors	Intervention
Christine Katlama and Eramune 01 team	ORVACS, Cytheris, Merck, Pfizer	IL-7 + HIV vaccine + intensification
Robert Murphy and Eramune 02 team	Northwestern University, ORVACS, NIAID, Pfizer, Merck	HIV vaccine + intensification
Steve Deeks, Adriana Andrade	UCSF, Johns Hopkins Univ.	Dibutyltin
David Margolis	University of North Carolina, NIH, Merck	SAHA
Sharon Lewin	Merck, Alfred Hospital in Melbourne, Australia	SAHA
Joseph Alvarado, Richard Ambinder	NHLBI	Cytoreductive therapy for lymphoma
John Mellors	University of Pittsburgh, NCI	Chemotherapy for lymphoma
Joseph Lalezari, Ronald Mitsuyasu, Isabella Sierra, Ana Sizemore, Winson Tang	Quest Clin. Res., UCLA, Kinder Med. Grp., Orlando Imm. Ctr., Sangamo Biosciences	Autologous CD4s w/CCR5- gene
Pablo Tebas, David Stein, Carl June	University of Pennsylvania, Sangamo	Autologous CD4s w/CCR5- gene
Anitta Krishnan	Beckman Res. Inst., City of Hope (Duarte, CA), NCI	Autologous stem cells w/CCR5- and anti-HIV genes
Frank Maldarelli	NIAID, NCI	Interferon $\alpha 2B$

NIH, NCI, NIAID, NHLBI = U.S. National Institutes of Health and branches
ORVACS = Objectif Recherche Vaccin SIDA

Trithérapie vs pentathérapie dans une infection VIH aiguë ou récente

- 40 patients avec infection aiguë ou récente

Randomisation (1:2)

- trithérapie TDF/FTC + ATV/r ou DRV/r qd
- pentathérapie avec en plus RAL 400 mg bid + MVC 150 mg bid

- 34 patients analysables (3 arrêts prématurés dans chaque bras)

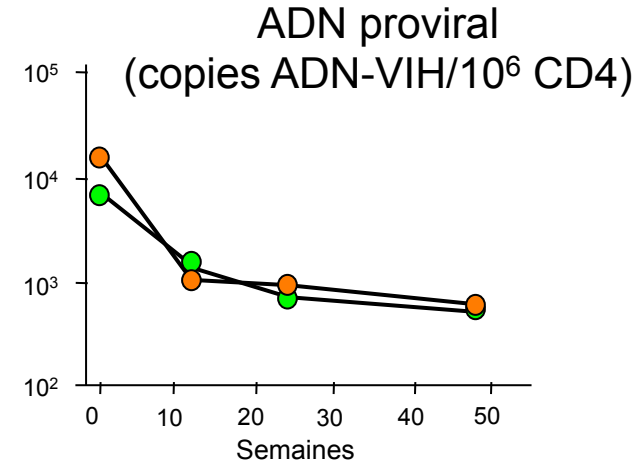
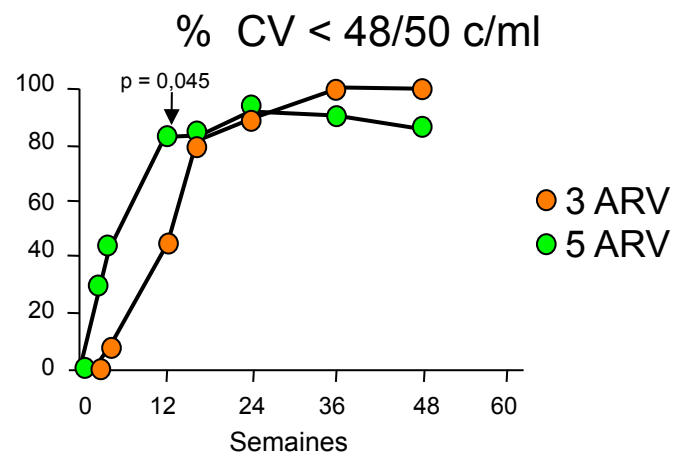
	3 ARV (n = 11)	5 ARV (n = 23)	p
Facteurs de risque	HSB 10/1 H hétérosexuel	HSB 100 %	-
Symptomatique (%)	100	91	-
Durée moyenne estimée de l' infection, jours	48 (27-77)	54 (19-155)	-
CV moyenne, log ₁₀ c/ml	6,3 (4,8-7,0)	5,6 (3,1-6,4)	0,17
CD4/mm ³ , moyenne	405 (305-524)	539 (230-1 066)	0,15

- Critère principal : indétectabilité à S48 (test Roche Amplicor/TaqMan 1.0 [limite détection : 48/50 c/ml] et test ultrasensible à 1 c/ml)

Trithérapie vs pentathérapie dans une infection VIH aiguë ou récente

Résultats à S48	3 ARV (n = 11)	5 ARV (n = 23)	p
CV < 48/50 c/ml	11/11 (100 %)	20/23* (87 %)	0,53
CV < 1 c/ml	3/11 (27 %)	9/21 (43 %)	0,46

* 3 échecs virologiques dans le bras 5 ARV : 2 CV toujours détectables à S36, 1 CV indétectable à S12 mais rebond à bas niveau à S48



- Décroissance plus rapide de la CV. Effet significatif sur le % de pts <50cp/ml jusqu' à S12
- Pas de différence sur l' ADN proviral



Trithérapie vs pentathérapie

dans une infection VIH aiguë ou récente

Résultats à S96

- ❑ CV ultrasensible: 3/11 vs 9/18 détectable ($p=0,21$)
- ❑ ADN proviral: pas de différence
- ❑ ARNm cellulaire: niveau plus faible sous pentathérapie (en prenant seult pts en succès)
- ❑ Pas de différence sur les marqueurs immunologiques (CD4, CD8, sCD14)
- ❑ Pas de différence sur la reconstitution immune dans le GALT (CD4, activation, prolifération)
- ❑ Le réservoir viral à S96 est corrélé à l'ADN proviral et est inversement corrélé au % de CD4 , avant traitement

► **Bénéfice d' un traitement précoce sur la taille du réservoir**

Trithérapie vs pentathérapie

dans une infection VIH aiguë ou récente

- 60 patients avec infection aiguë (3-4 premières semaines)
 - Randomisation (1:1)
 - Trithérapie TDF/FTC/EFV ou RAL
 - Pentathérapie TDF/FTC/EFV/RAL/MVC
 - 35 patients analysables de sous-type CRF01_AE; CV=5,5 log cp/ml; CD4=409/mm³
 - Pas de différence entre les 2 groupes sur la baisse de la CV et sur l'ADN proviral (sang et sigmoïde)
 - L'ADN total au moment de la primo-infection est d'autant plus faible que l'infection est récente
 - L'ADN total au moment de la primo-infection prédit le réservoir viral après 24 semaines de tt
- **Bénéfice d'un traitement précoce sur la taille du réservoir, confirmé sur cette 2nde étude**

MARAVIBOOST : essai randomisé évaluant TDF/ FTC + RAL $\pm$ MVC en traitement de 1^{ère} ligne

- Etude ouverte espagnole, 30 patients naïfs, en infection récente (<6 mois) avec souche VIH-1 R5

	TDF/FTC + RAL (n = 15)	TDF/FTC + RAL + MVC (n = 15)	p
Caractéristiques à l' inclusion			
CD4 médiane/mm ³ [IQR]	428 [327-606]	421 [311-617]	0,71
CD8 médiane/mm ³ [IQR]	1 123 [975-1 624]	1 024 [719-1 973]	0,24
CV médiane, log ₁₀ c/ml [IQR]	4,8 [4,3-5,5]	5,1 [4,2-5,3]	0,95
Résultats à S12 et S24			
CV < 50 c/ml, n (%)	11 (73 %)	13 (87 %)	0,36
Gain en CD4 à S12 (/mm ³)	+ 142	+ 283	0,01
Gain en CD4 à S24 (/mm ³)	+152	+ 226	0,11

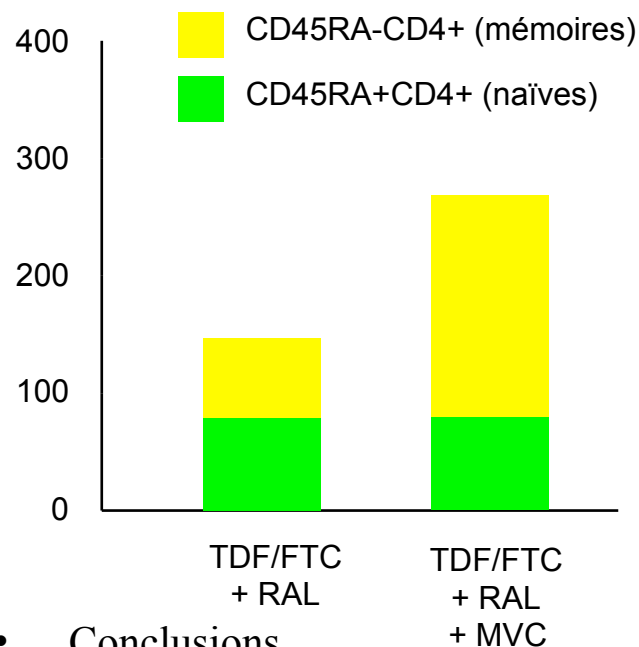
MARAVIBOOST : essai randomisé évaluant TDF/FTC + RAL ± MVC en traitement de 1^{ère} ligne

- Diminution significative de l'ADN proviral entre J0 et S48 dans les 2 groupes.
Différence entre les groupes à S24 (p= 0,034). Pas de différence entre les groupes à S48.
- Diminution significative de l'ADN intégré entre J0 et S48 seulement dans le groupe intensifié avec le MVC
- Augmentation transitoire de l'ADN épisomal juste après l'initiation du TT dans les 2 groupes
Meilleure baisse et plus précoce de l'ADN épisomal dans le groupe intensifié avec le MVC

► **Absence de bénéfice majeur sur le réservoir viral**

MARAVIBOOST : essai randomisé évaluant TDF/FTC + RAL $\pm$ MVC en traitement de 1^{ère} ligne

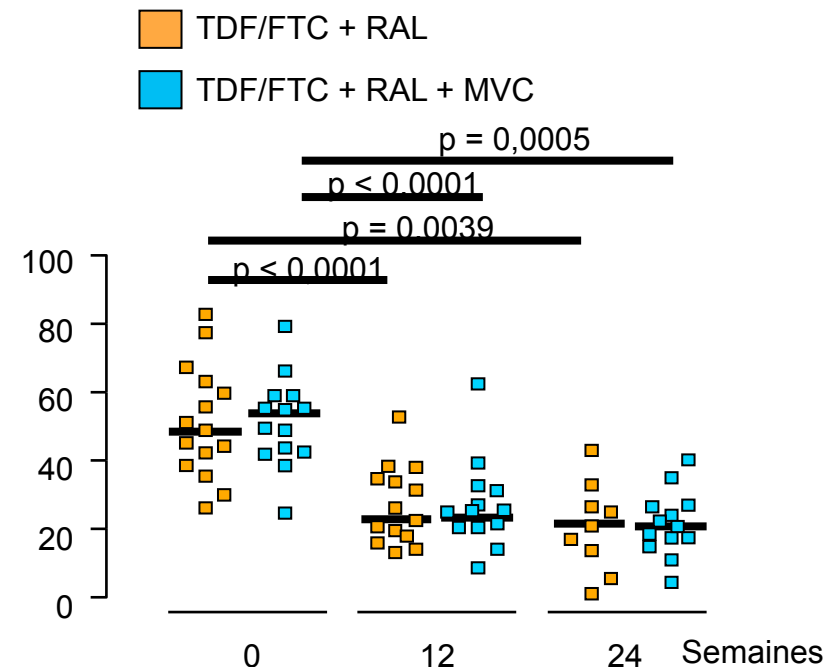
Gain en CD4/mm³
mémoires et naïves à S12



- Conclusions

- Gain en CD4 majoré transitoirement par MVC (CD4 mémoires) à S12. Pas de différence à S48.
- Réduction de l'activation lymphocytaire similaire dans les 2 bras

Activation CD8
(% CD38+CD45RO+)



Massanella M, CROI 2011, Abs. 547

Puertas MC et al. Fifth HIV Persistence Workshop 2011, Abs. 41

The diagram illustrates the regulation of HIV transcription by histone acetylation and deacetylation. It shows the HIV LTR structure with regions U3, R, and U5. In the 'HIV Replication' state, histone acetyltransferase (HAT) acts on nucleosomes (nuc-0 to nuc-1), leading to increased transcription. In the 'HIV Latency' state, histone deacetylase (HDAC) acts on nucleosomes, leading to decreased transcription. The diagram also shows the involvement of Tat, RNA polymerase II, and the proximal end of the U3 LTR.

Purger les réservoirs cellulaires de VIH : le valproate n'est pas efficace

□ Critères d'inclusion

- CD4 > 200/mm³
- CV < 50 c/ml
- HAART depuis > 12 mois

□ Intervention

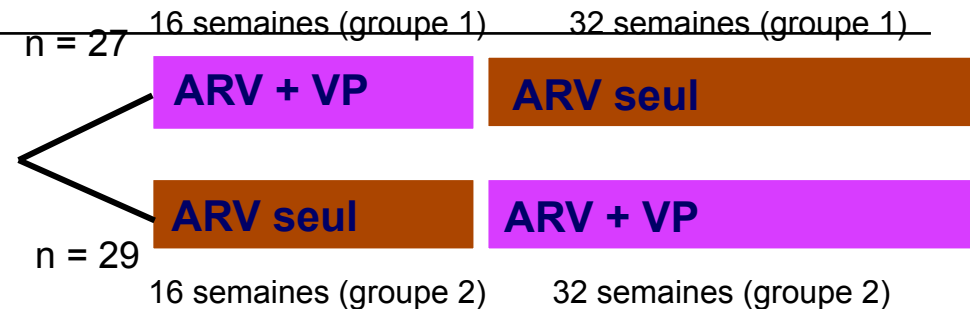
- Ajout valproate (VP) po 500 mg bid
- pendant 16 ou 32 semaines, par randomisation

□ Résultats

- Absence de diminution significative des cellules CD4 mémoires ADN VIH+

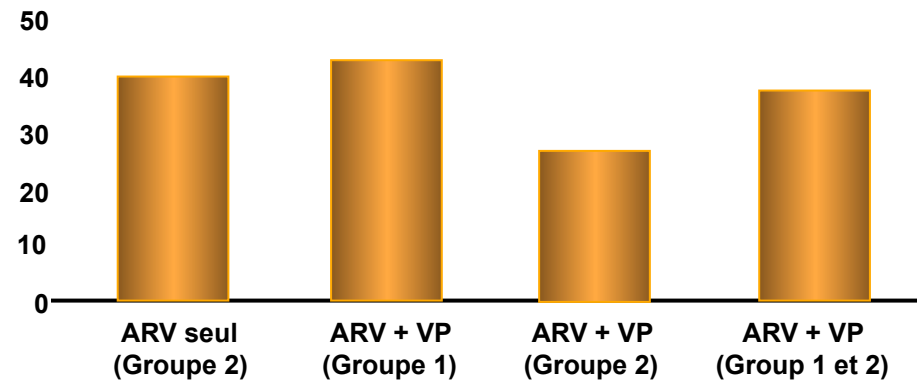
□ Conclusion

- Tolérance VP acceptable
- Pas d'efficacité sur les réservoirs cellulaires



% de sujets avec réduction significative
des cellules CD4 mémoires ADN VIH+

p = 0,13



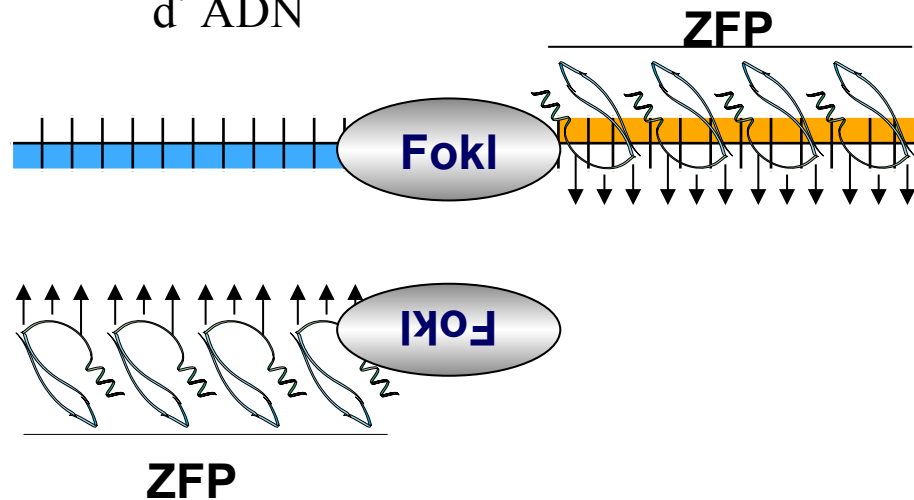
Effet du Vorinostat (SAHA)

- In vitro, puissant inducteur de l'expression et de la production virale dans les cellules T CD4⁺ au repos des patients TT et avirémiques (0.25–0.5 μ M- 40 fois plus puissant que l'acide valproïque)
- Phase I/II « proof of concept » une dose de 200 mg, 400 mg ou 600 mg de VOR
 - Evaluer ex vivo la modification de l'expression ARN dans les cellules T CD4⁺ au repos
 - Evaluer la tolérance
- Résultats:
 - Augmentation significative de l'expression ARN viral (4,4x en moyenne) dans les cellules T CD4⁺ au repos
 - Bonne tolérance d'une seule dose
- Mais, il s'agit d'un mutagène. Effet d'une exposition prolongée ?

Greffe de cellules CD4+ à CCR5 inactivé

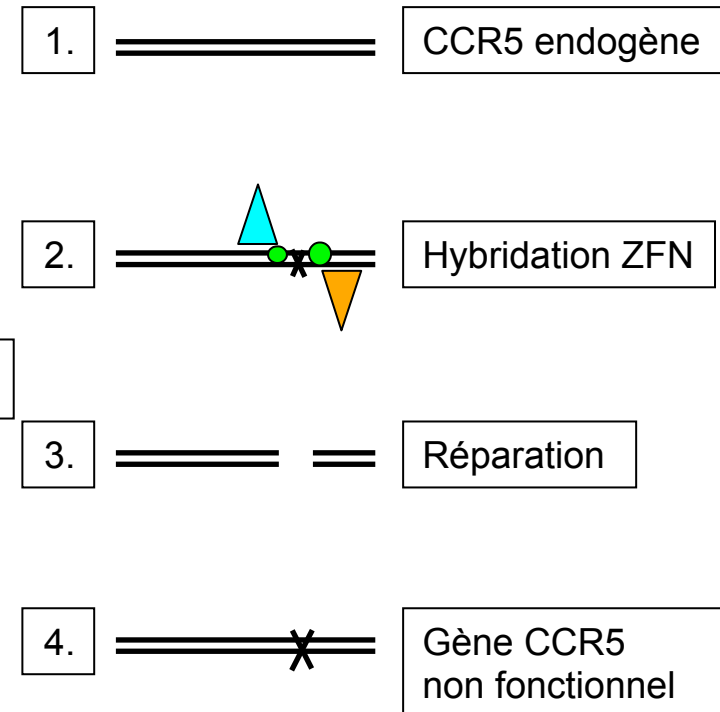
Technologie « *Zinc Finger Nuclease* »

- « *Zinc Finger Nuclease* (ZFN) » comprend une enzyme de restriction (nucléase FokI) et une protéine en doigt de Zinc (ZFP) qui cible spécifiquement des séquences (12 nucléotides) d'ADN



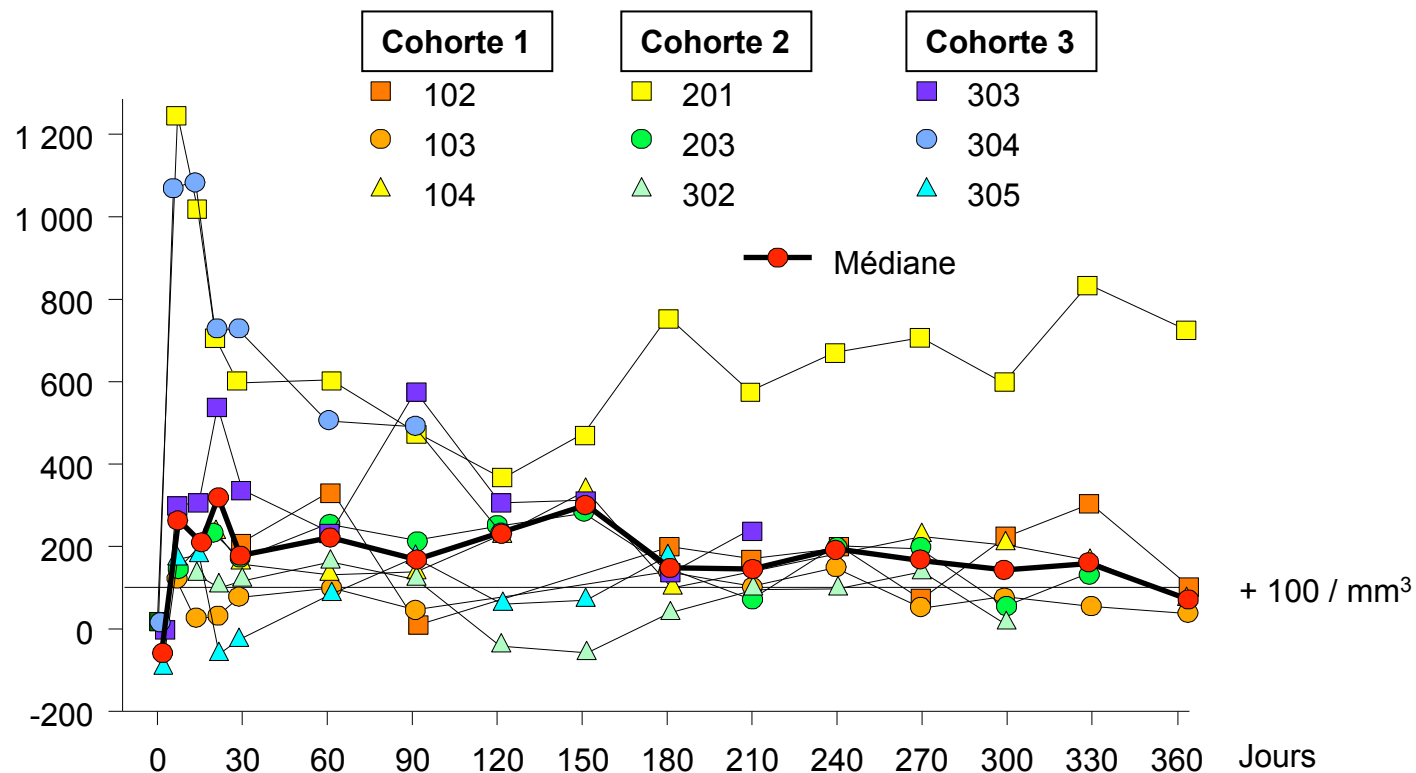
La ZFN va cibler une région du gène CCR5 en amont de celle concernée par la délétion $\Delta 32$

L'activité de ZFN va aboutir à un gène CCR5 non fonctionnel



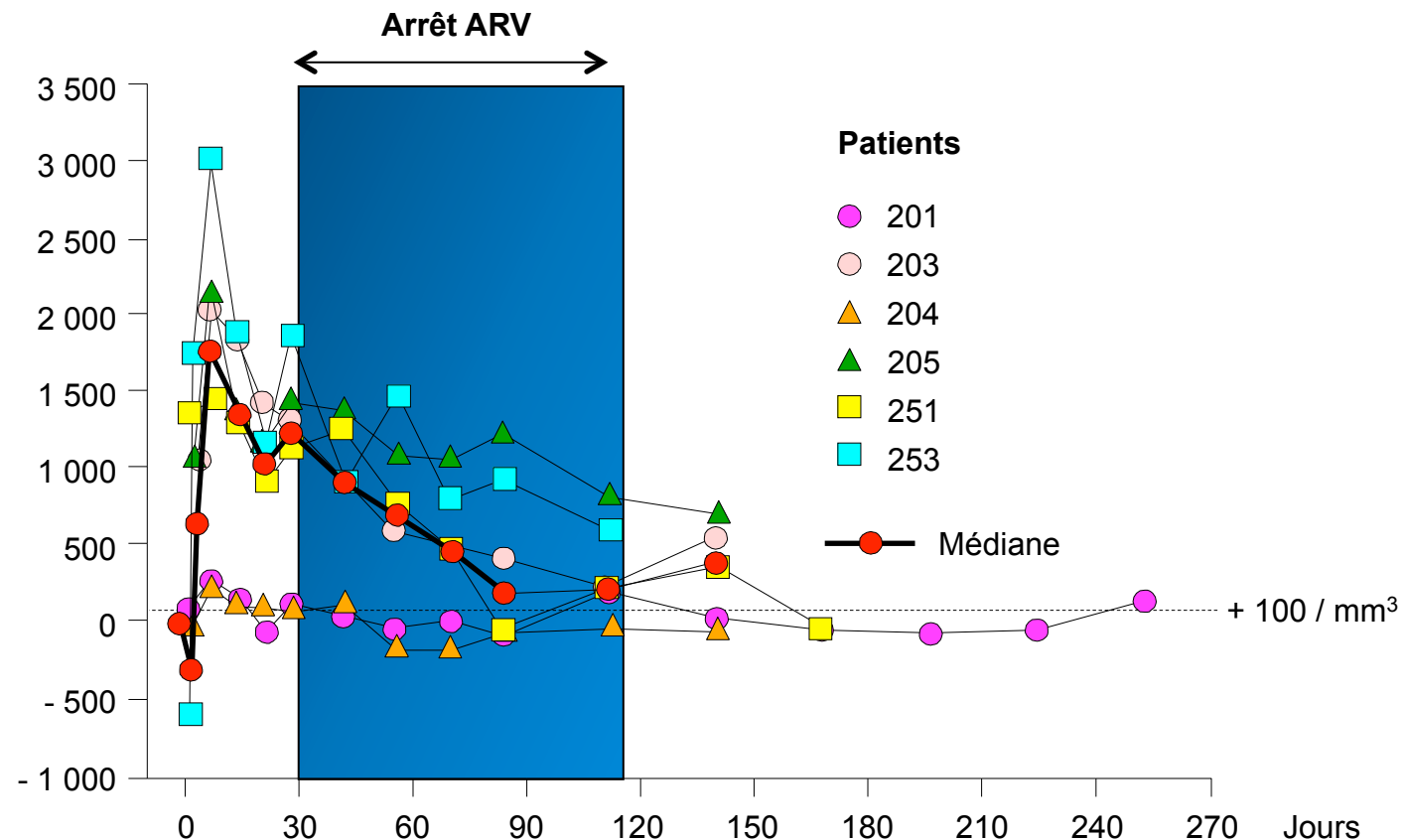
Greffe autologue de cellules CD4⁺ à CCR5 inactivé chez des patients sous traitement ARV avec CV < 48 c/ml, et CD4 entre 200 et 500/mm³

Augmentation du nombre de cellules CD4 dans le sang périphérique
après une injection de cellules à CCR5 modifié



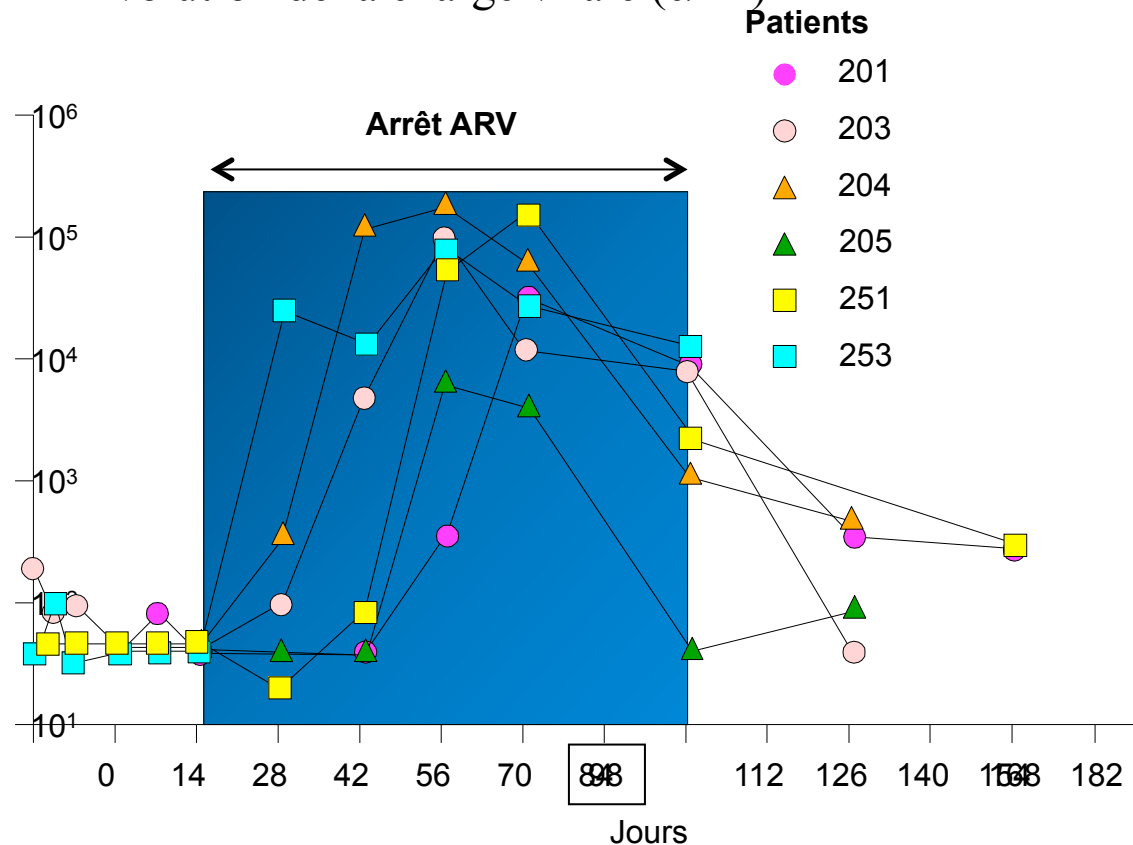
Interruption des ARV après greffe autologue de cellules CD4⁺ à CCR5 inactivé chez des patients sous traitement ARV avec CD4 > 450/mm³

Augmentation du nombre de cellules CD4/mm³ dans le sang périphérique après une injection de cellules à CCR5 modifié



Interruption des ARV après greffe autologue de cellules CD4⁺ à CCR5 inactivé chez des patients sous traitement ARV avec CD4 > 450/mm³

Evolution de la charge virale (c/ml)



- Pendant l'interruption des ARV, 3 des 6 patients ont une diminution de CV d'au moins 0,8 log par rapport au pic de rebond
- Le patient 205 ayant une délétion hétérozygote $\Delta 32$ sur gène CCR5 a une CV qui devient indétectable
- Le pourcentage de cellules CD4 à CCR5 modifié bi-alléliques est corrélé à la réduction de la CV lors de l'interruption

Conception des essais cliniques en vue de l'éradication virale

- Objectifs ?
 - Eradication totale du virus
 - « Cure fonctionnelle »: stabilité clinique en l'absence de tt
 - Réduction de la virémie résiduelle
 - Réduction du réservoir latent dans les compartiments
- Critères de jugement ?
 - Effet quantitatif sur le réservoir
 - Absence de virémie après une interruption des ARV
 - Rebond vs absence de rebond
 - Délai jusqu'au rebond
 - Niveau de la virémie à l'état d'équilibre
- Population cible ?
 - Pts avec CV contrôlée
 - « Elite controllers »
 - Pts en primo-infection
 - Pts nécessitant une greffe de moelle
- Type d'essais ?
 - Phase 3 randomisée ou non
 - Durée ? Réponse à S24 après l'arrêt du TT (modèle VHC)



Questions

- Dans la stratégie du « Shock and Kill »
 - Faut-il mieux induire l'expression virale, voire la réplication virale ou la diminuer complètement jusqu'à une latence complète? (stratégie anti-latence ou stratégie latence)
 - Le virus produit sera-t-il forcément éliminé si la latence est perturbée ?

- Dans la stratégie d'éradication
 - Quels sont les effets d'une ou de plusieurs expositions à ces composés qui perturbent la latence et le fonctionnement cellulaire ?
 - L'évaluation clinique doit être bien tolérée et sans risque en raison du succès des traitements ARV et de l'espérance de vie actuelle des patients infectés