

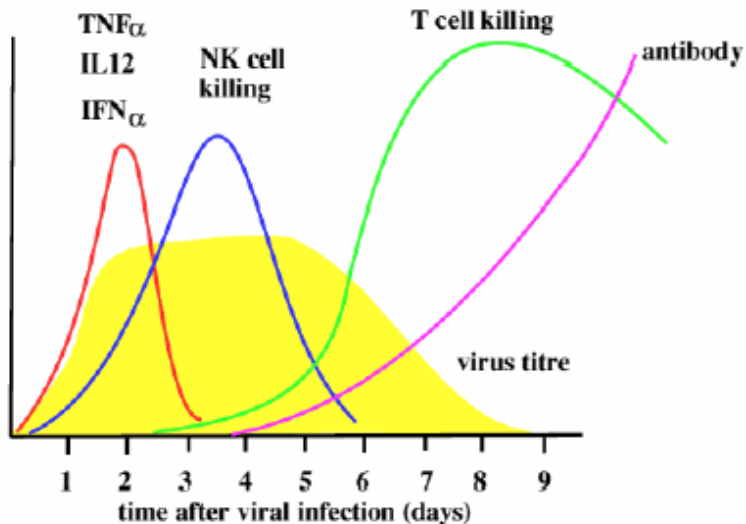
ERADICATION DU VIH ?

Laurence Morand-Joubert
Isabelle Pellegrin

VIROSEM 2014- Lyon

REPONSE IMMUNITAIRE ANTI-VIRALE

intracellulaire obligatoire



□ Immunité innée

- Production d'IFN de type I (α et β) par les cellules infectées +++ et les pDC
- Lyse des cellules infectées par les cellules NK, activées par IFN et IL-12
- Activation du complément

□ Immunité adaptative

- LT CD8+ cytotoxiques
- Ac Nt

Réponses
Immunitaires
innées

Rapides,
peu diversifiées, spécificité dégénérée, efficacité restreinte
pas de mémoire

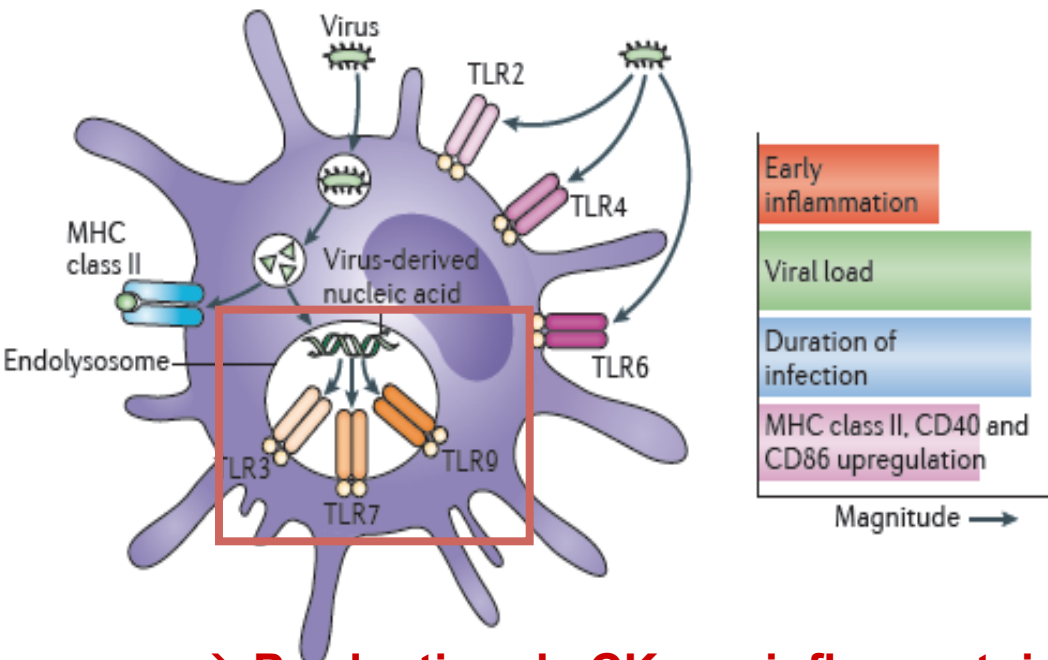
Réponses
Immunitaires
adaptatives

lentes,
très diversifiées, spécificité haute, efficacité forte
mémoire

RI innée: Réaction inflammatoire

Reconnaissance des PAMP viraux par les PRR cellulaires

VIRUS: PAMP = ligands intracellulaires



PRR = TLR intracellulaires

TLR3 : ARN double brin
 TLR7/8 : ARN viral simple brin
 TLR9 : ADN viral

L'efficacité du ciblage des PRR peut déterminer le succès de la réplication du pathogène ou de l'immunité protectrice...

Swain, Nat Rev Immunol 2012

→ Production de CK pro-inflammatoires (environnement cytokinique), chimiokines...

IL-1

Effets locaux

Activation Endoth vasculaire
 Activation lymphocytaire

Effets systémiques

Fièvre
 Protéines phase aigue foie:
 CRP, IL-6

TNF- α

Effets locaux

Activation endoth vasculaire
 Augmentation perméabilité vasc

Effets systémiques

Fièvre
 Mobilisation des métabolites

IL-6

Effets locaux

Activation lymphocytaire
 Production AC

Effets systémiques

Fièvre
 protéines de la phase aigue

IL-12

Effets locaux

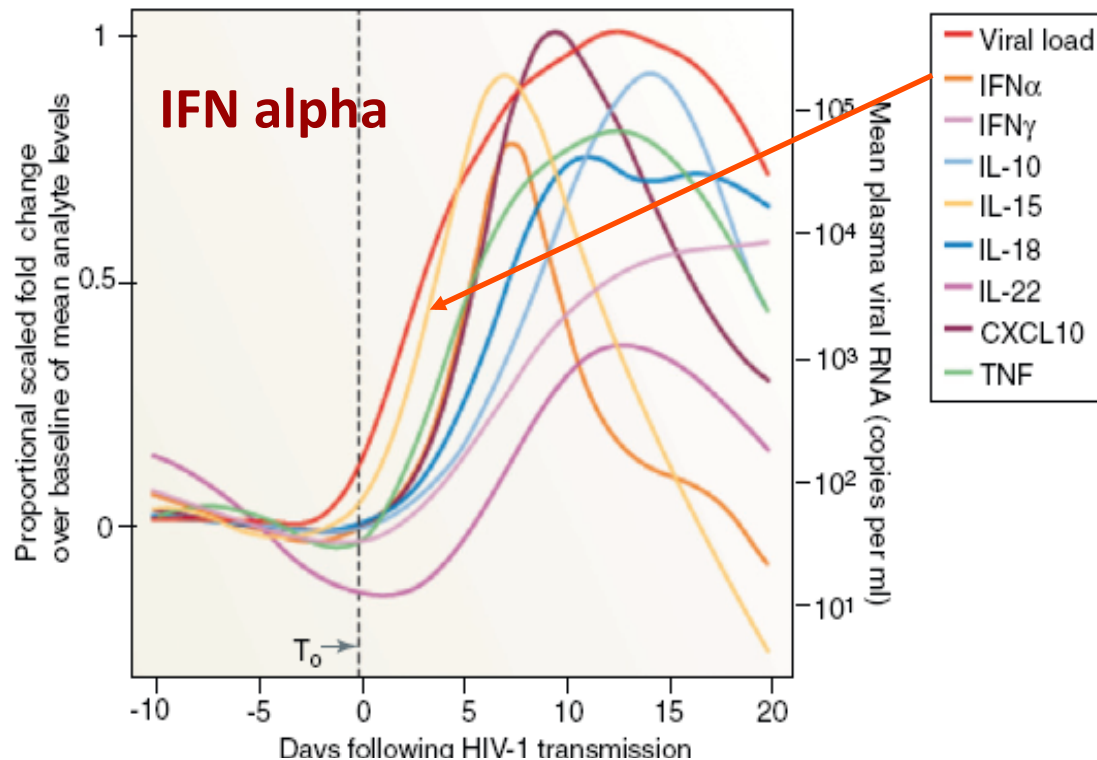
Activation NK
 Différenciation T Th1

RI innée: Réaction inflammatoire

Reconnaissance des PAMP viraux par les PRR cellulaires

La « tempête » cytokinique au cours de la PIV

La production précoce d' **IFN alpha** induit des facteurs de restriction antirétroviraux



IFN α : Activité ANTI-VIRALE et ACTIVATION IMMUNE CHRONIQUE

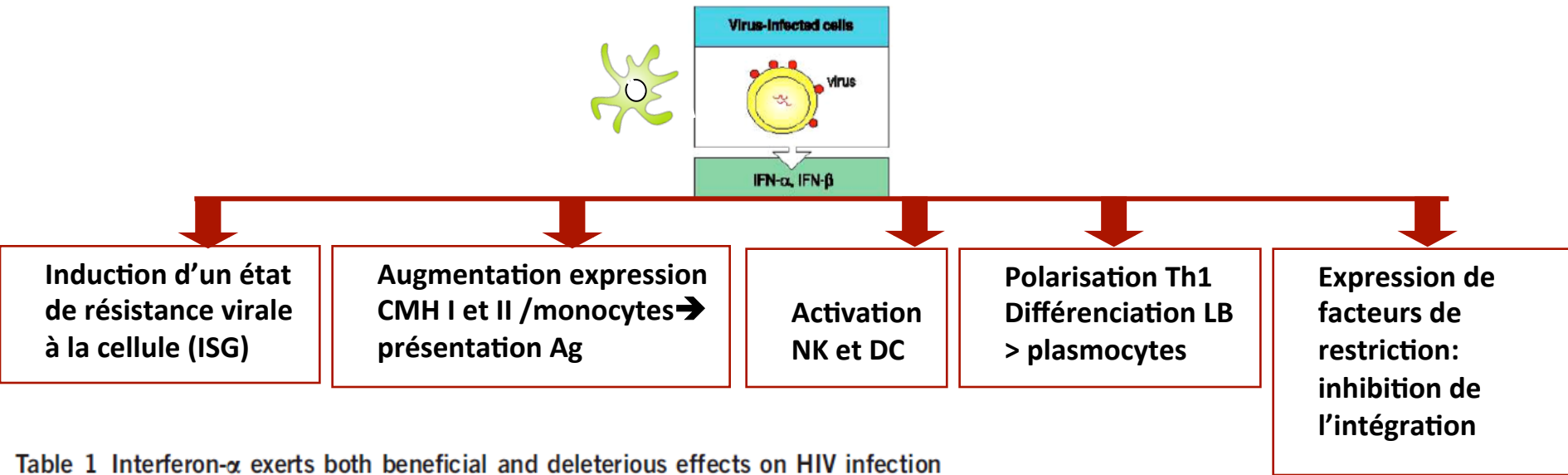


Table 1 Interferon- α exerts both beneficial and deleterious effects on HIV infection

<i>Effects of IFN-α associated with control of HIV infection</i>	<i>Effects of IFN-α associated with immune activation and dysfunction in HIV infection</i>
Post-entry inhibition of HIV infection by MX2	Increased expression of CD38 on CD8 ⁺ T cells
Restriction of HIV replication in dendritic cells by APOBEC3 family proteins	TRAIL-induced apoptosis of CD4 ⁺ T cells and memory B cells
Restriction of HIV-1 release by BST-2	Increased expression of Bak in T cells leading to Fas-dependant apoptosis
IFN- α -dependant NK cell activation	Increased activation-induced, but decreased IL-7-induced, proliferation of T cells

Abbreviations: APOBEC3, apolipoprotein B mRNA-editing, enzyme-catalytic, polypeptide-like 3; BST-2, bone marrow stromal cell antigen 2; IFN, interferon; IL, interleukin; NK, natural killer; TRAIL, tumour necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand.

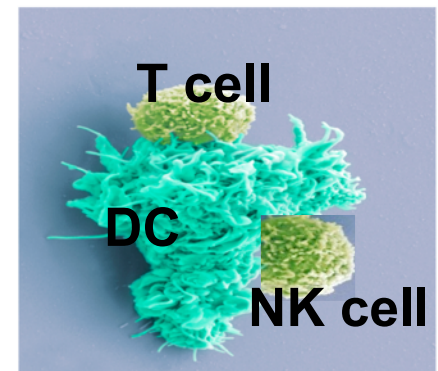
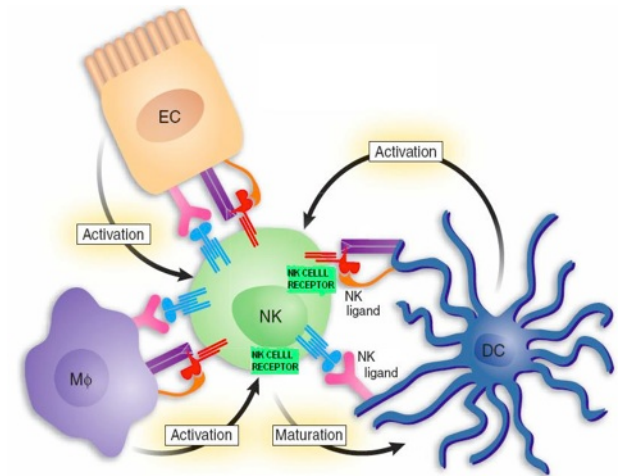
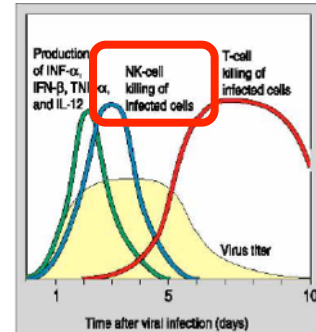
Déplétion LT
Rôle des monocytes activés (CD16+, sCD14, CD163) dans la dissémination VIH (SNC, CV)
Entretien du réservoir VIH

→ **IFN therapy** chez patients indétectables avec CD4⁺ élevé: composant de la stratégie d'éradication (contrôle après IT, diminution ADN)

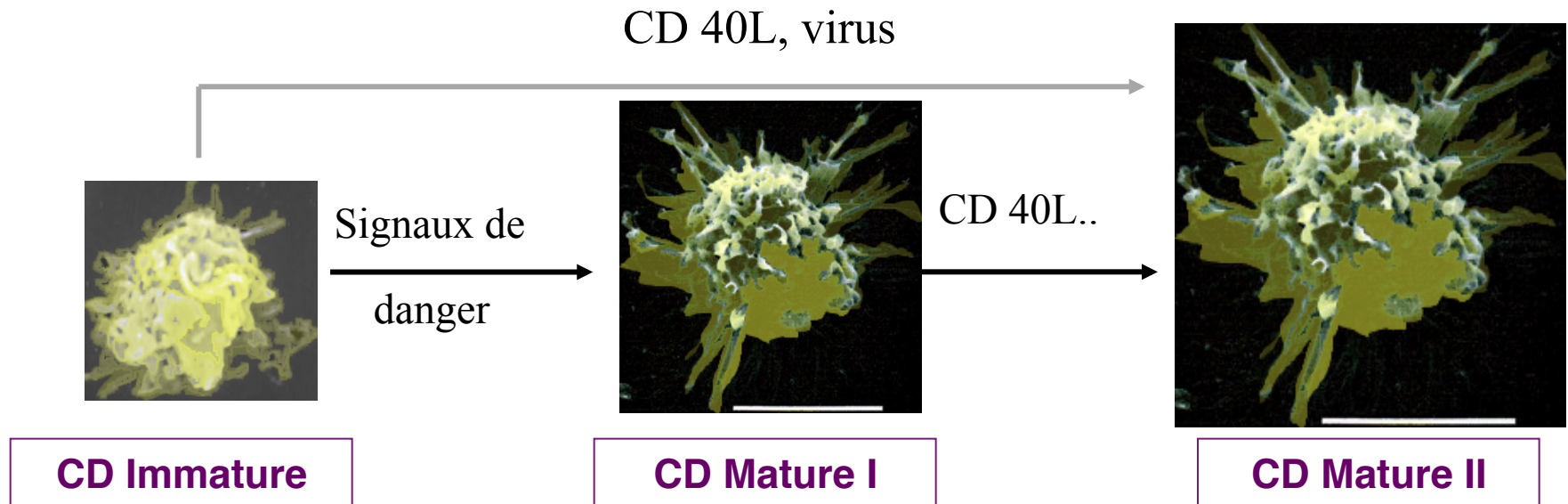
→ **Inhibiteurs d'IFN** (plaquenil et SLE /VIH, mAbs anti-IFN: en cours d'exploration)

RI innée: lymphocytes NK

- Lyse spontanée (sans activation ag) des cellules infectées:
 - Protéines contenues dans les granules (perforine, granzyme)
 - Cette cytotoxicité naturelle n'est pas restreinte par le CMH mais régulée par le CMH
- **Coopération cellulaires +++ :**
 - Sécrètent de l'IFN- γ qui active les macrophages
 - Activées par IL-12 produite par les macrophages, par IFN-I produits par les pDCs
- **Rôle antiviral important démontré** par les infections sévères associées à l'absence d'activité NK chez l'homme : herpès +++ (EBV, VZV, CMV ...)

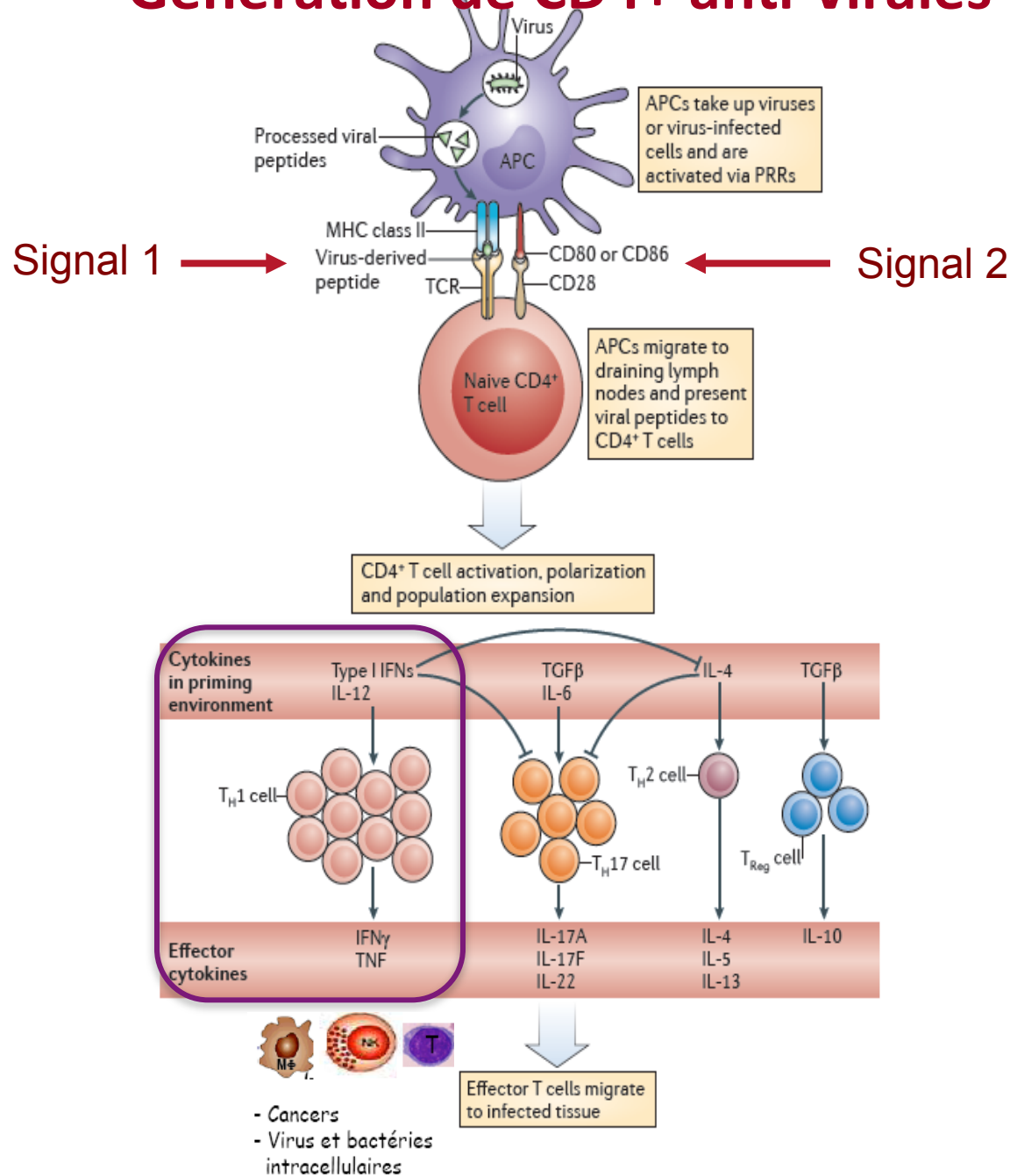


Lien Immunité Innée -> Immunité adaptative: la cellule dendritique



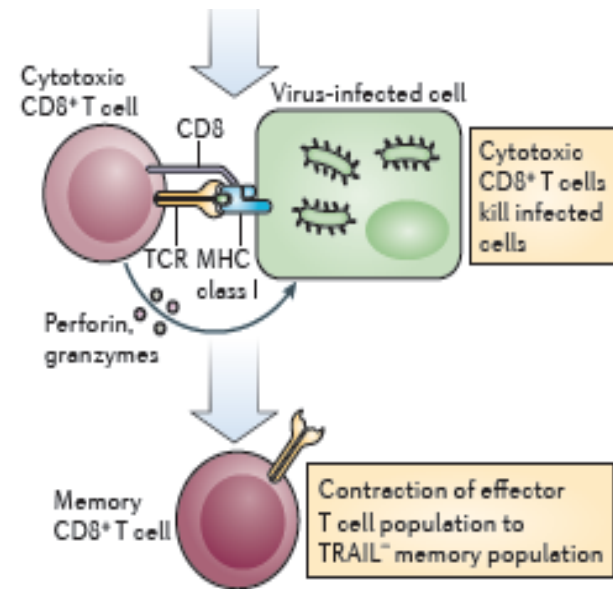
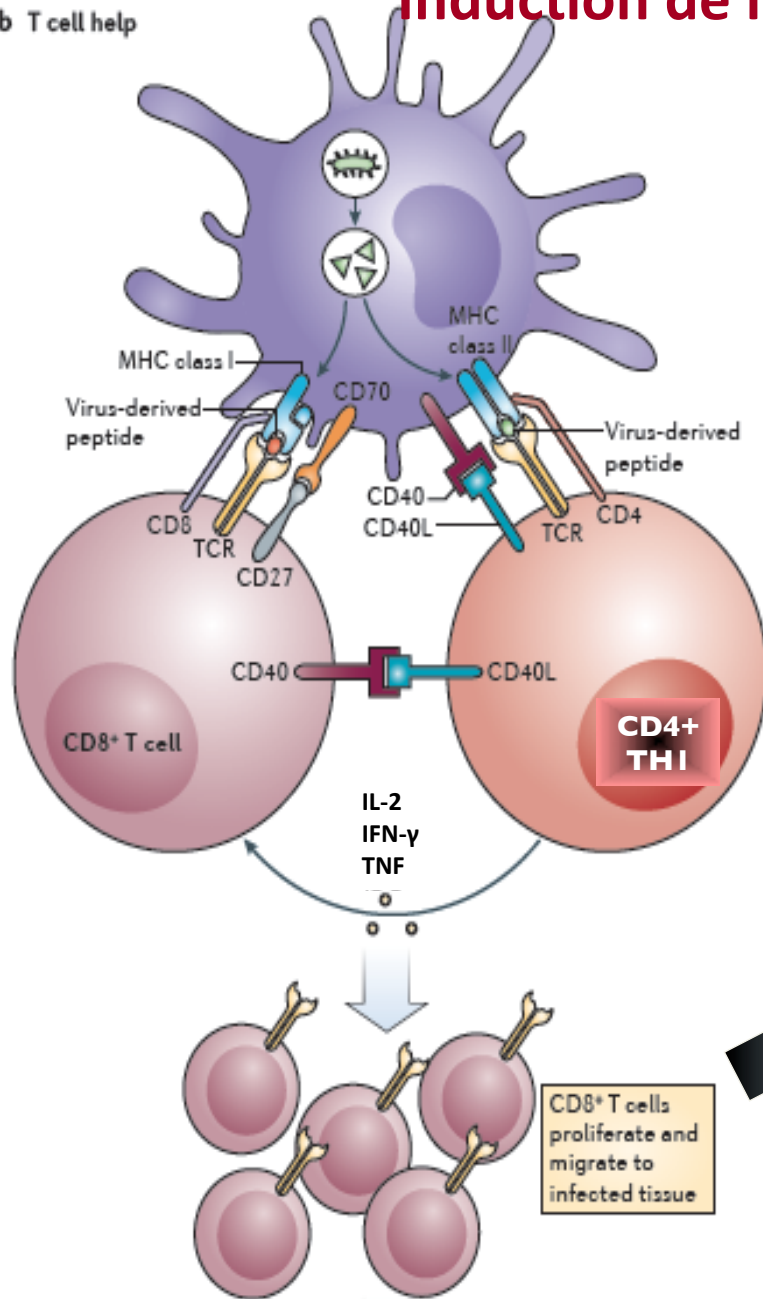
CD : capture de l'Ag, migration et maturation

Génération de CD4+ anti-virales effectrices



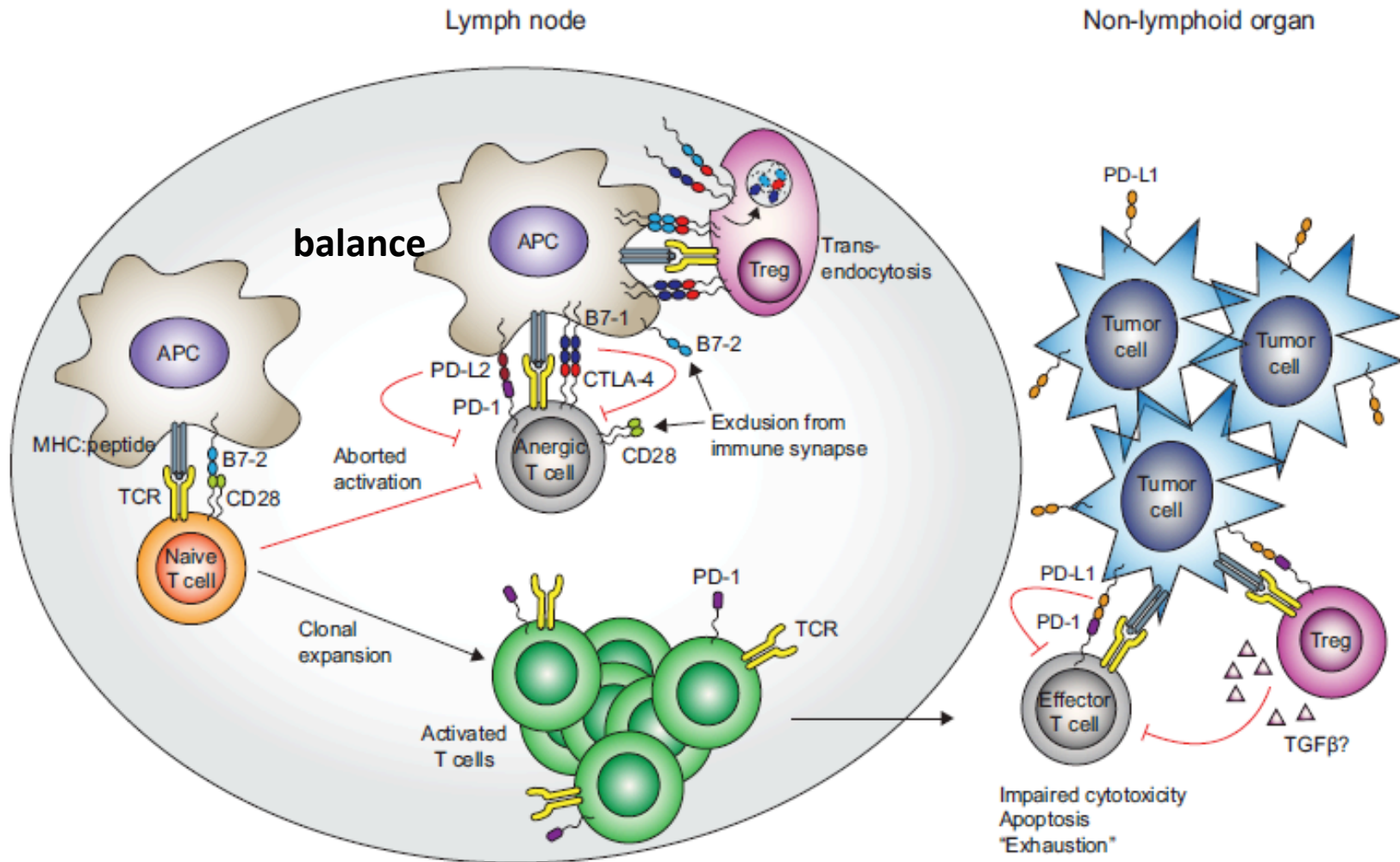
Coopération entre les cellules dendritiques et les CD4⁺ Th1 → Induction de la réponse CD8⁺ antivirale

b T cell help

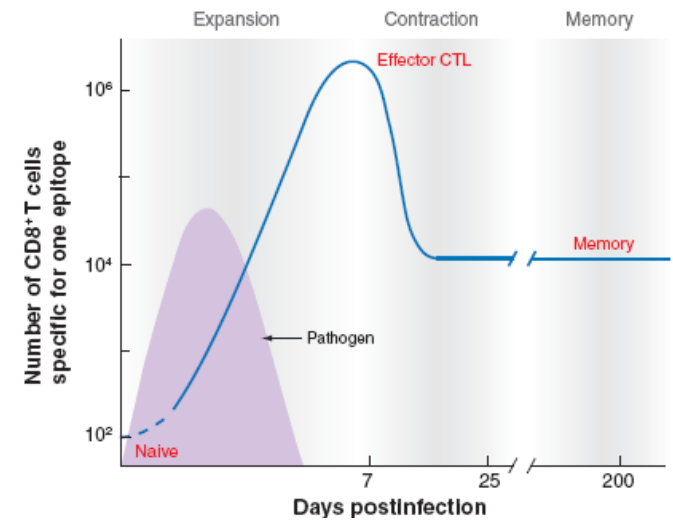
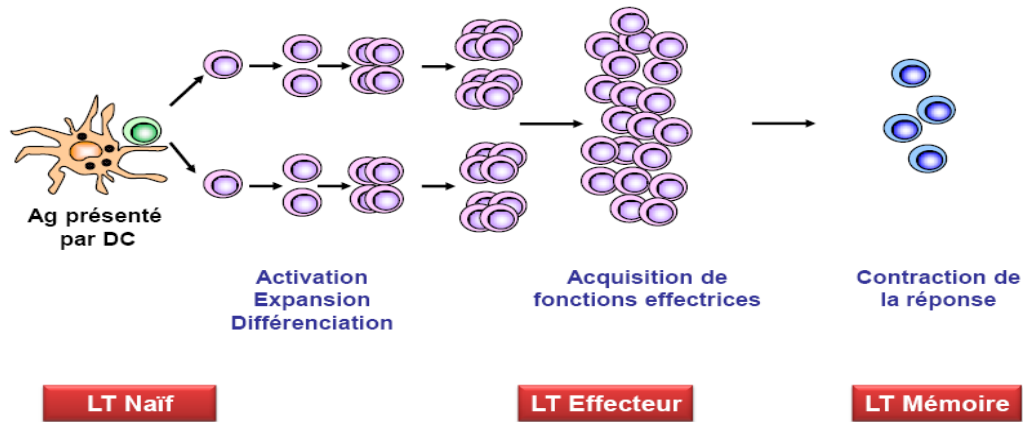


Réponse antivirale optimale: contraction de la RI

Treg, LT: expression de CTLA-4, PD-1 induits après activation des LT
→ assure une régulation de l'activation lymphocytaire.



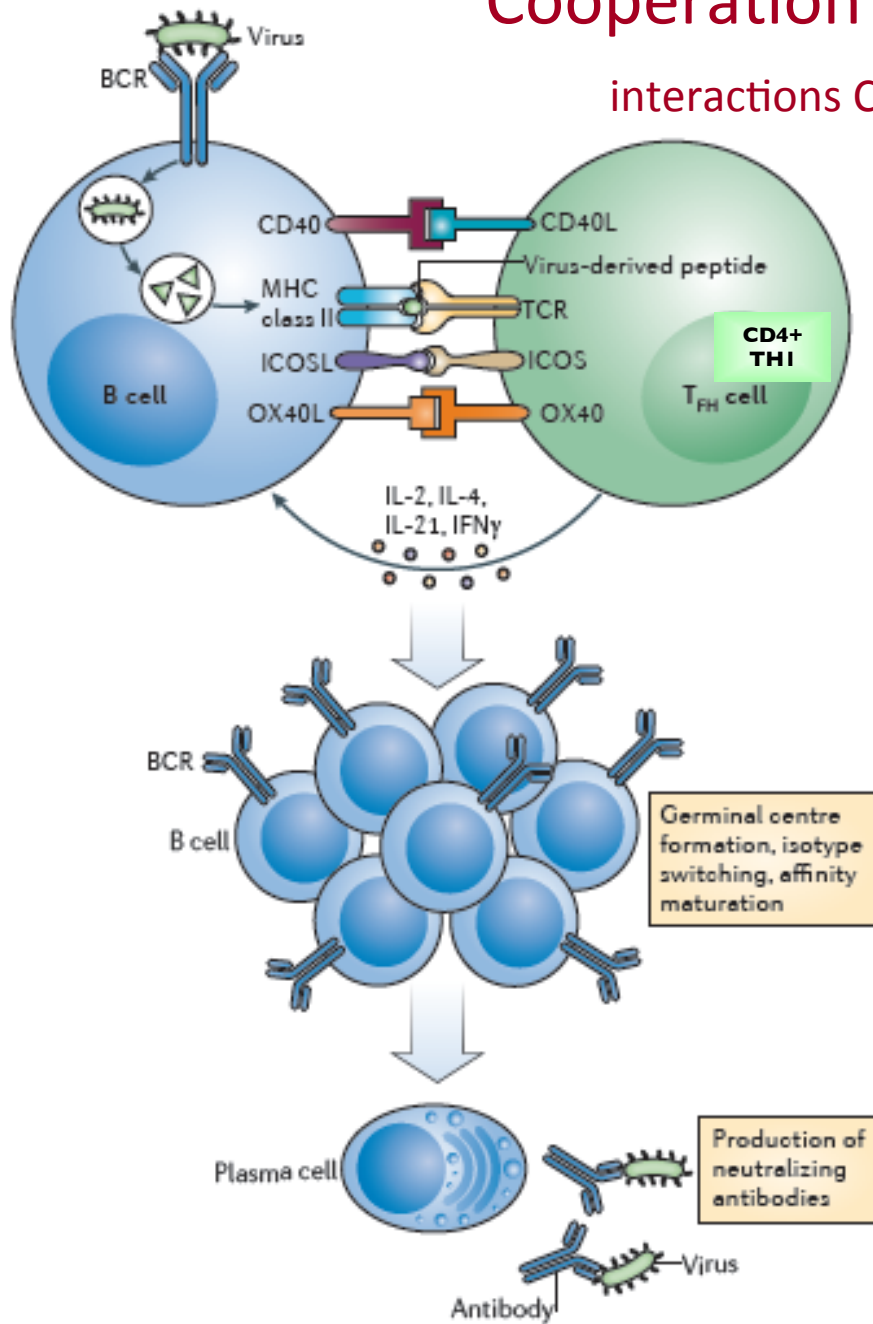
Réponse antivirale optimale: contraction de la RI



Treg, LT: expression de CTLA-4, PD-1 induits après activation des LT
→ assure une régulation de l'activation lymphocytaire.

Coopération LT CD4+ - Lymphocytes B

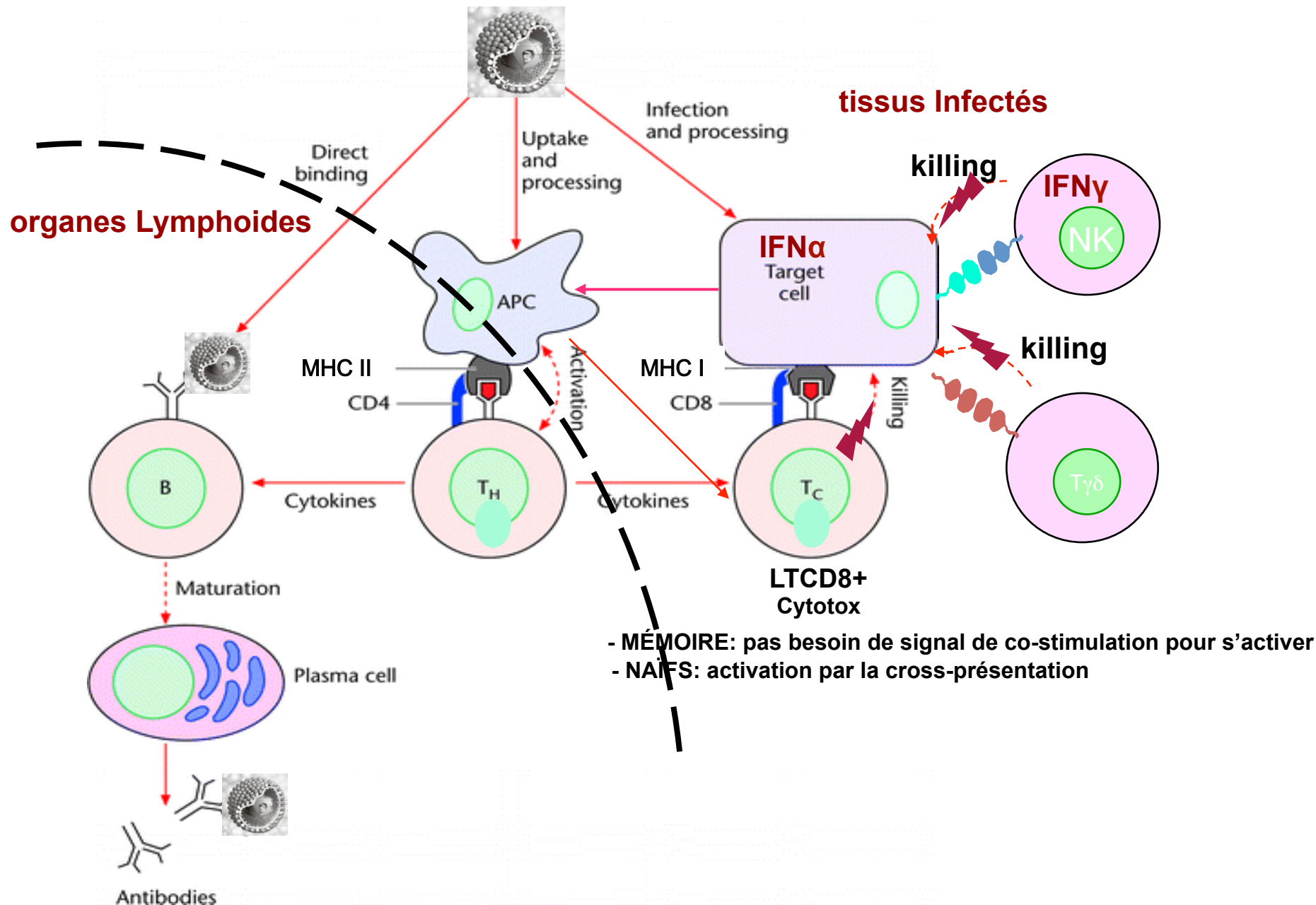
interactions CD40L- CD40 et production de CK



- Formation du centre germinatif
 - Switch isotypique des Ig
 - Maturation d'affinité des Ig
- ➔ Génération d'Ac neutralisants.

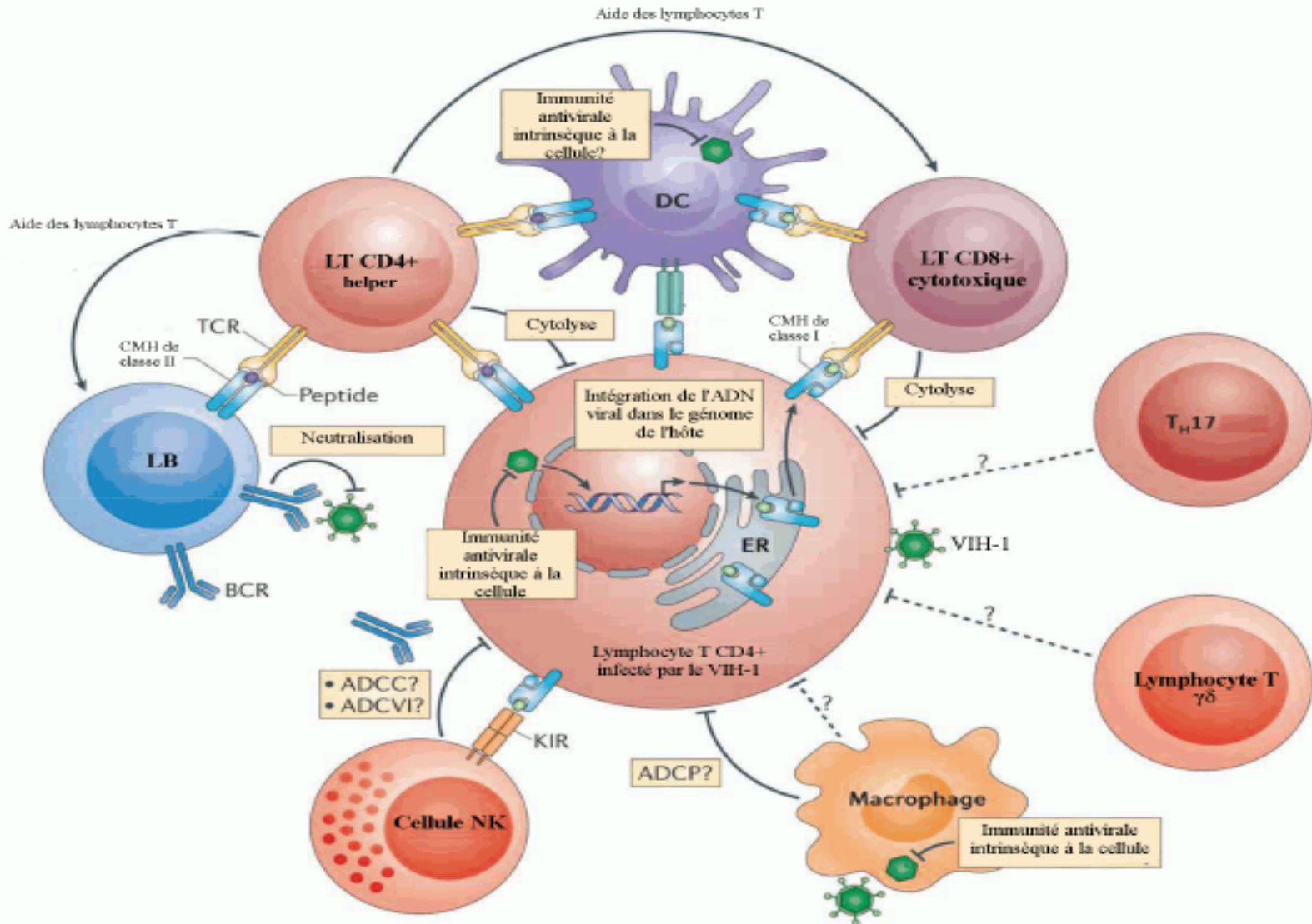
Réponse Immunitaire Anti-virale

RESUME

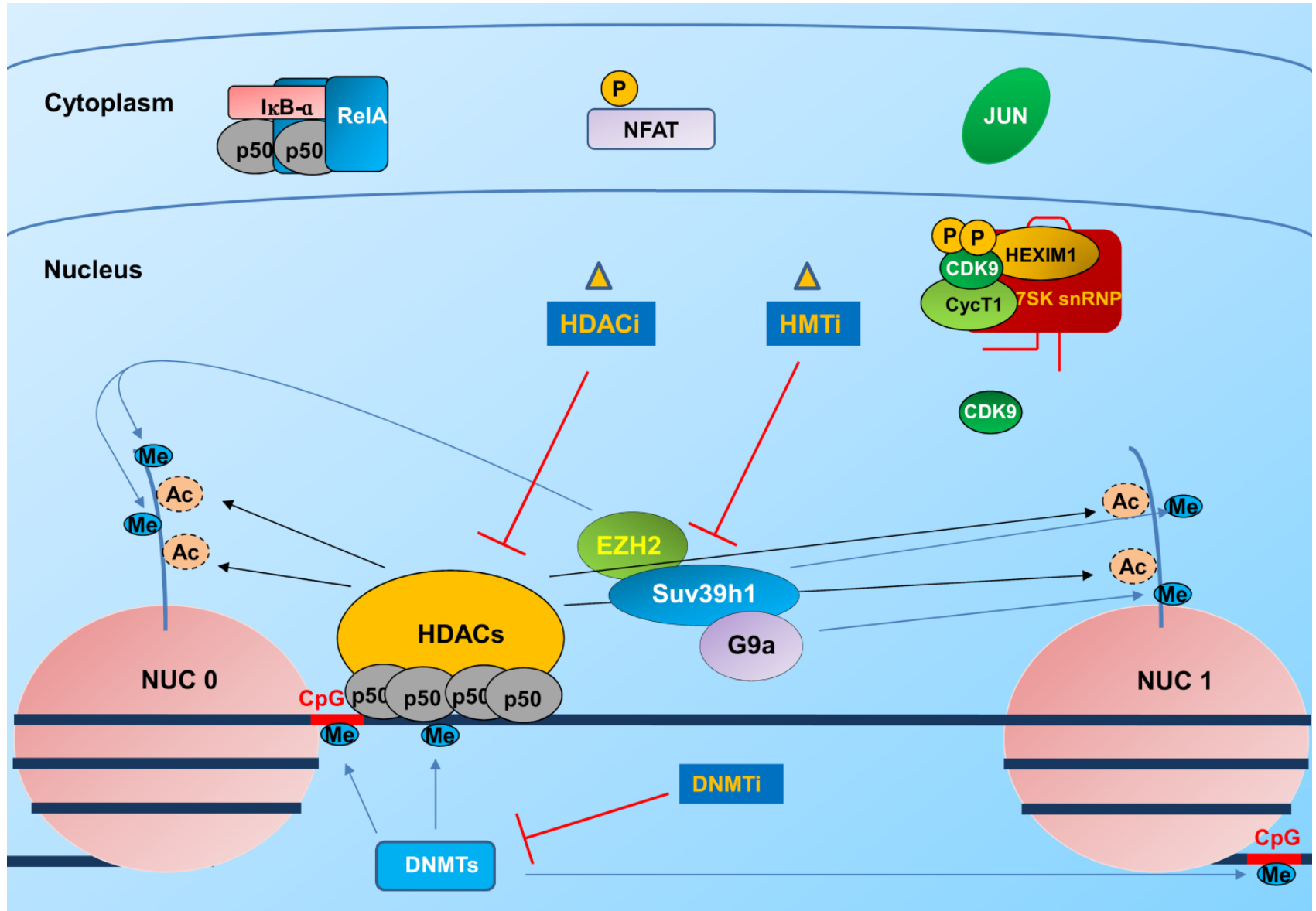


Causes possibles du contrôle de l'infection par le VIH-1 chez les VIH contrôleurs

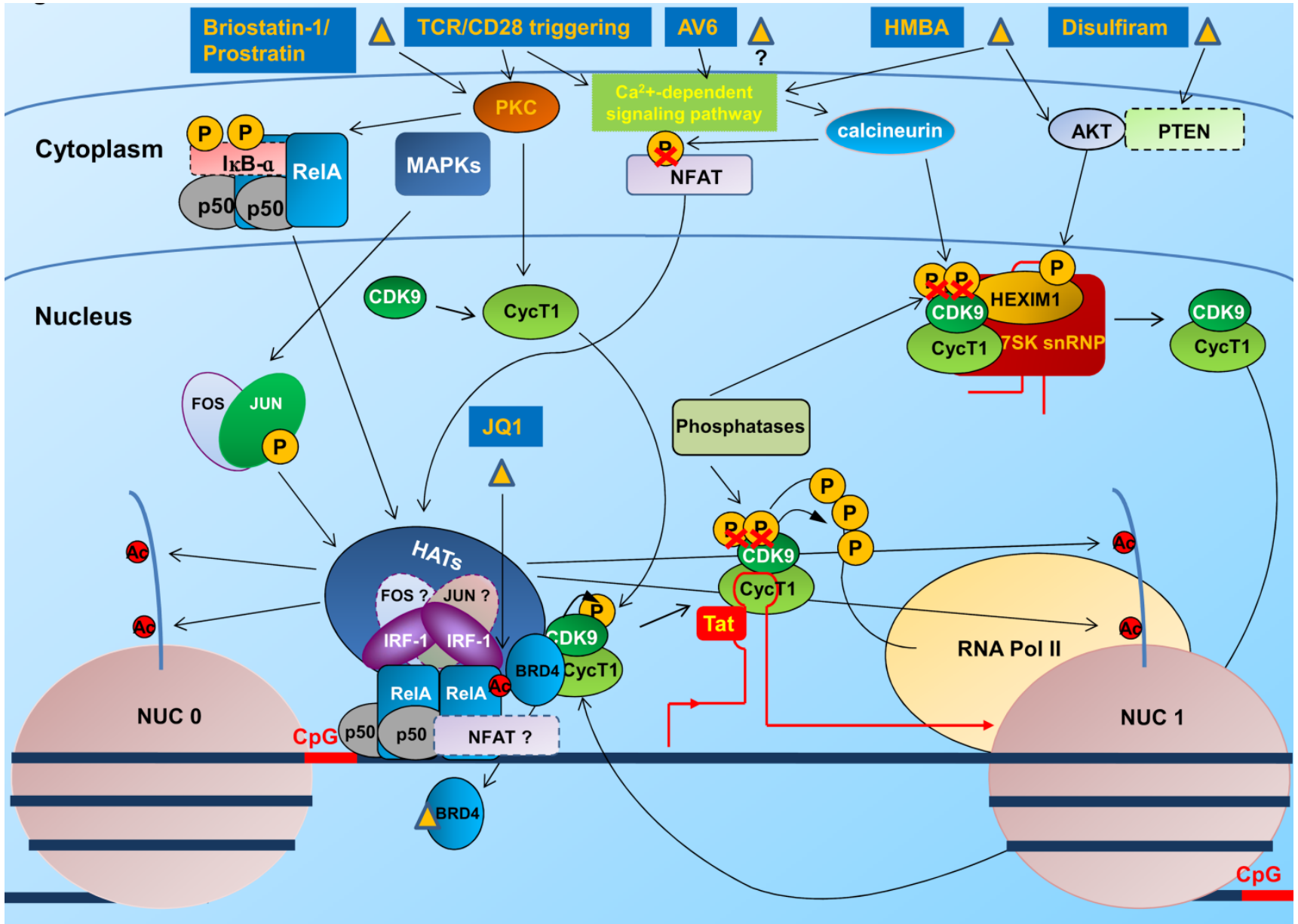
(d'après Walker and Yu, 2013)



MECANISMES DE LATENCE DU VIH

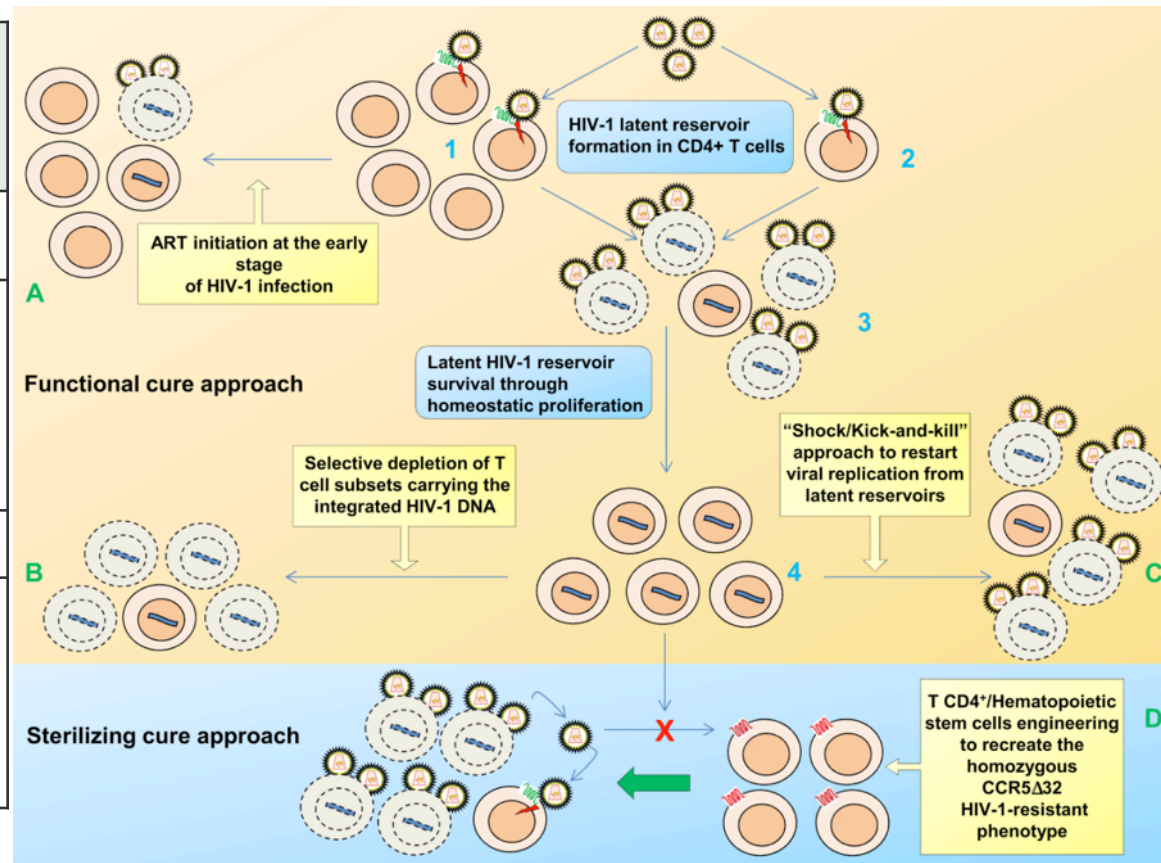


MECANISMES DE REACTIVATION DU VIH



Deux objectifs....à ambition différente!

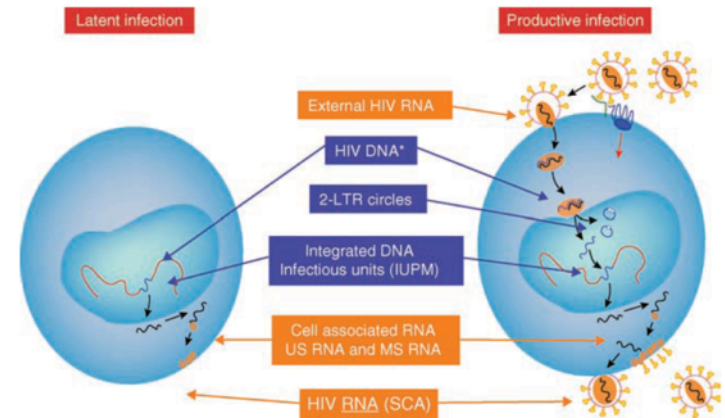
Eradication	Contrôle
Guérison	Cure fonctionnelle
Élimination de toutes les cellules infectées	Contrôle de l'infection à long terme sans traitement
ARN <1 cp/ml	ARN <50 cp/ml
Allogreffe de moelle (Patient de Berlin)	Elite controllers Controllers après l'arrêt du tt (Visconti)



Martinez-Picado J, AIDS 2012 - Washington, Abstract TUPL0101

Battistini A. Viruses 2014

Evaluation de la réplication résiduelle ou de la persistance virale



- Dans un réservoir très faible: $1/10^5$ - 10^6 cellules CD4 latentes, prédominant dans les cellules T CM
- **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

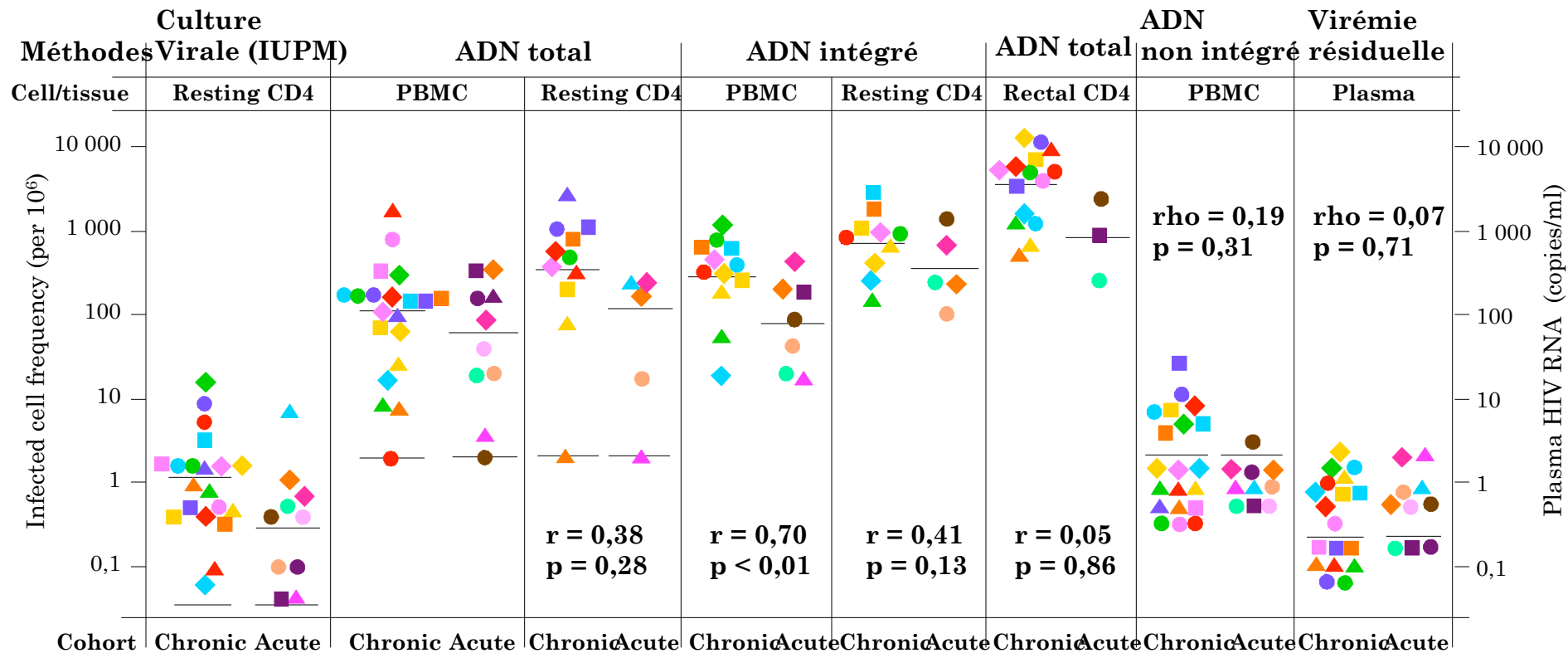
Evaluation de la réplication résiduelle ou de la persistance virale

19

Marqueurs d'évaluation de la persistance du VIH sous ARV

Méthode	Type de mesure
Culture virale (IUPM)	Capacité de la cellule à produire du virus infectieux
Quantification de l' ADN total par PCR	Mesure ADN intégré + ADN non intégré (circulaire)
Quantification de l' ADN intégré par PCR	Quantification à la fois du virus infectieux et défectifs
Quantification de l' ADN non intégré (circulaire) par PCR	Détection d' une réplication récente
Quantification de l' ARN intra-cellulaire par PCR	Mesure la transcription virale et donc d' une réplication
Virémie résiduelle par PCR ultrasensible (US)	Quantification de la réplication virale plasmatique en dessous du seuil de détection (<20-50 cp/ml)

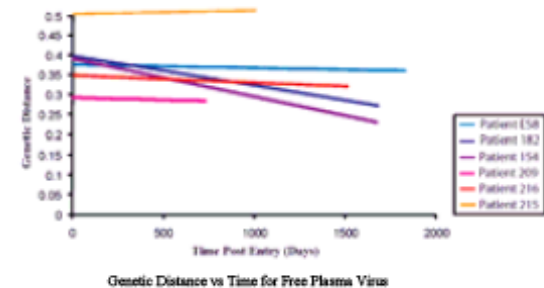
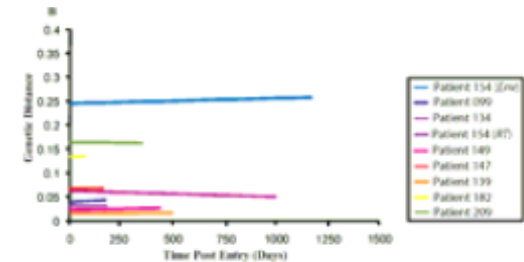
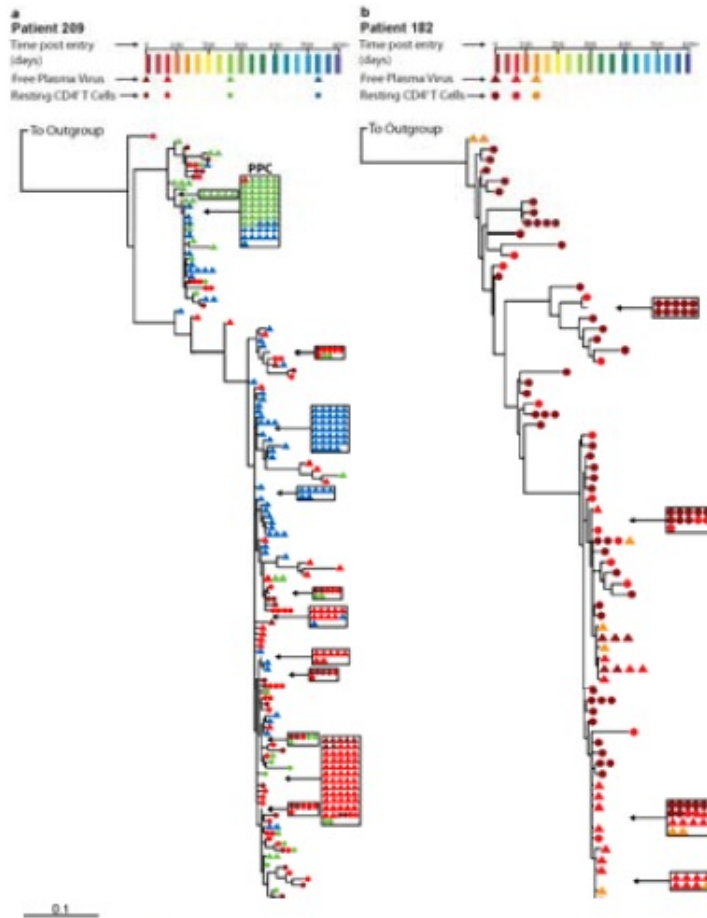
Evaluation de la réplication résiduelle ou de la persistance virale



D'après Eriksson et al, Plos Pathogens, 2013

Evaluation de la réplication résiduelle ou de la persistance virale

Evolution virale: marqueur indirect de la réplication virale

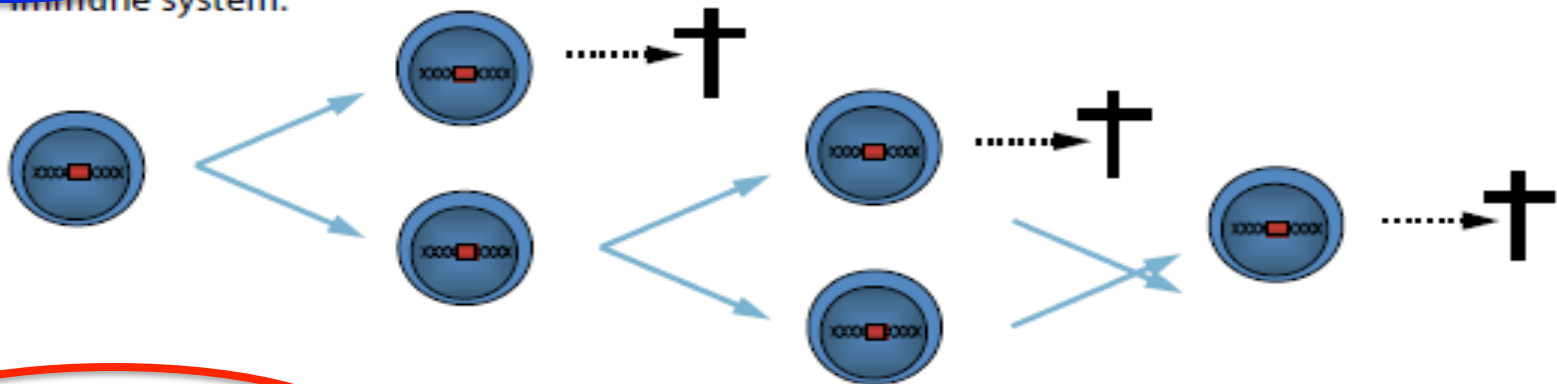


Mécanismes de la persistance du VIH sous traitement efficace

T cell survival: Reservoir cells are memory T cells. These cells, which are generated after infection or vaccination, keep the memory of the immune systems for decades.



Proliferation: Reservoir cells, like other memory T cells, divide very slowly to maintain the memory of the immune system.



Ongoing viral replication at low levels and replenishment of the pool of infected cells.

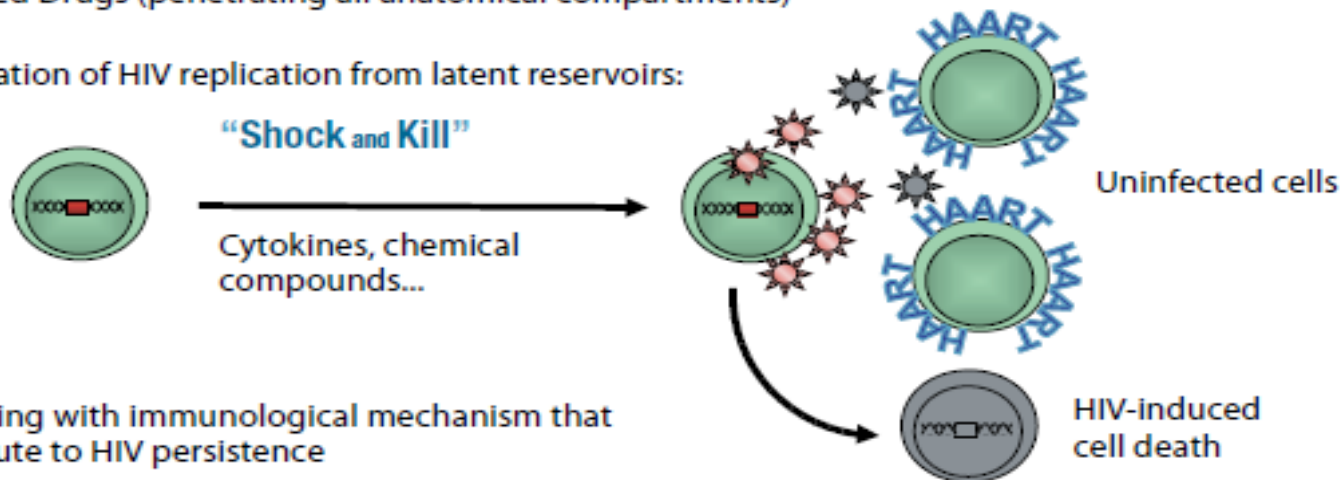


Illustrations adapted from Nicolas Chomont, VTGI Florida.

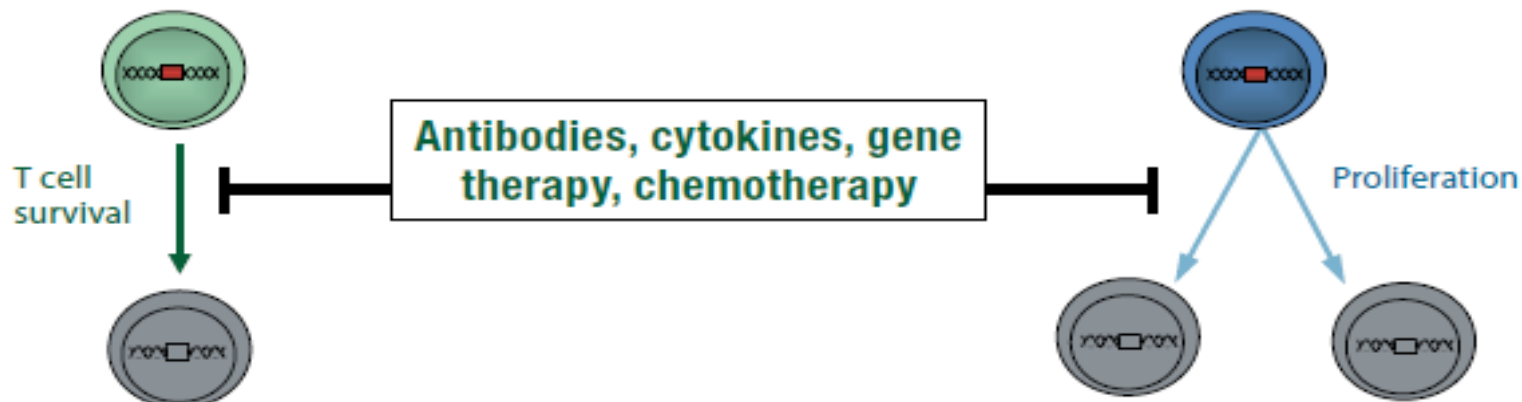
Strategies to control/eradicate reservoirs

- Intensification of HAART (+/- other interventions)
- Early initiation of HAART (limit viral reservoir size)
- Improved Drugs (penetrating all anatomical compartments)

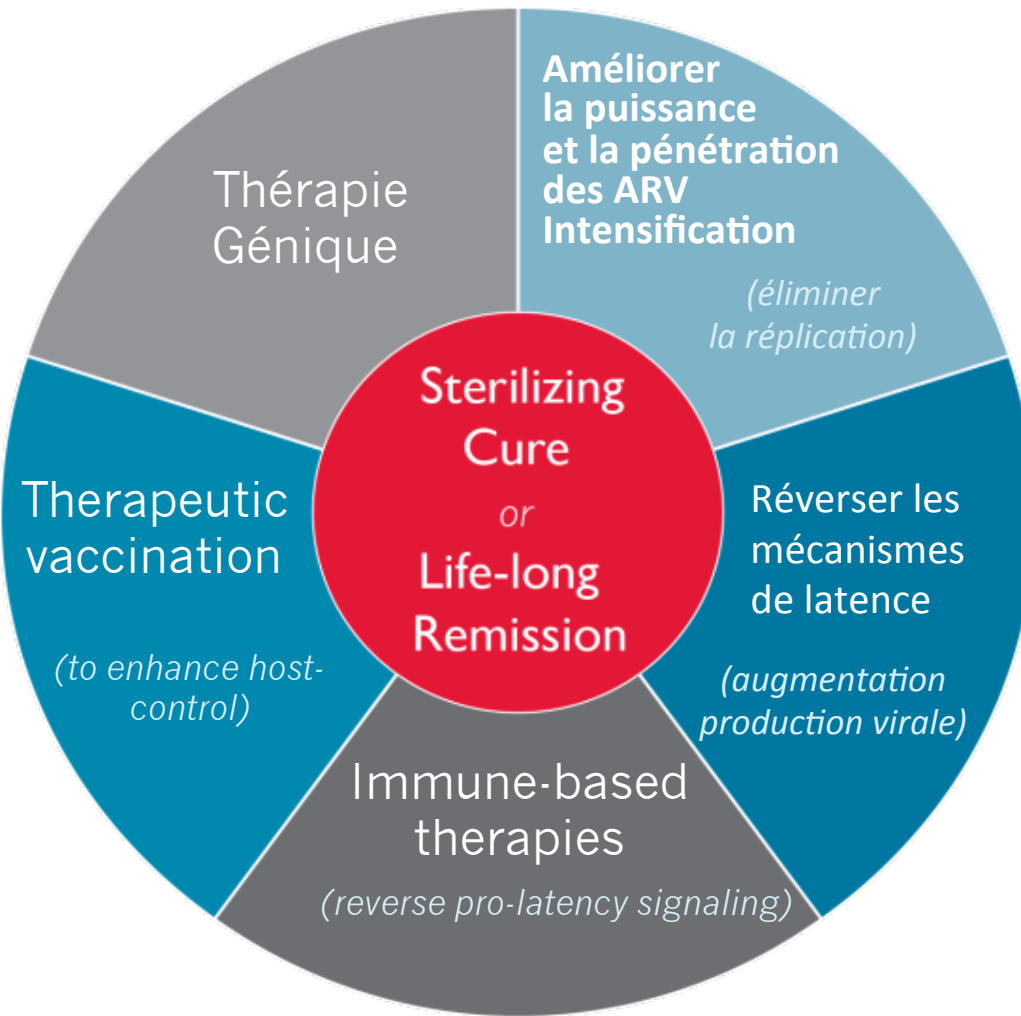
- Reactivation of HIV replication from latent reservoirs:



- Interfering with immunological mechanism that contribute to HIV persistence
- Other therapeutic interventions (gene/molecular therapy, therapeutic vaccine)



Les stratégies d'éradication ou de rémission à long terme



1- Greffe et thérapie génique

Patient de Berlin

Doigts de Zinc

Allogreffes

2- Diminution du réservoir viral

Intensification ARV

Intensification ARV + Vaccination thérapeutique

ARV +/- Intensification + Immunomodulation

Diminution de l'activation Immune chronique

3- Réversion de la latence virale:

Shock and Kill

Shock

Kill

Vaccination thérapeutique

CTL

Anticorps Neutralisants

Radioimmunothérapie

Blocage Immune checkpoint

hématopoïétiques CCR5 $\Delta 32$ homozygote

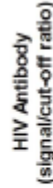
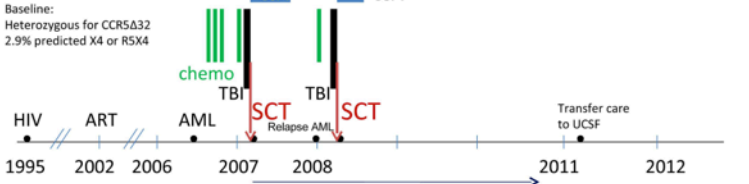
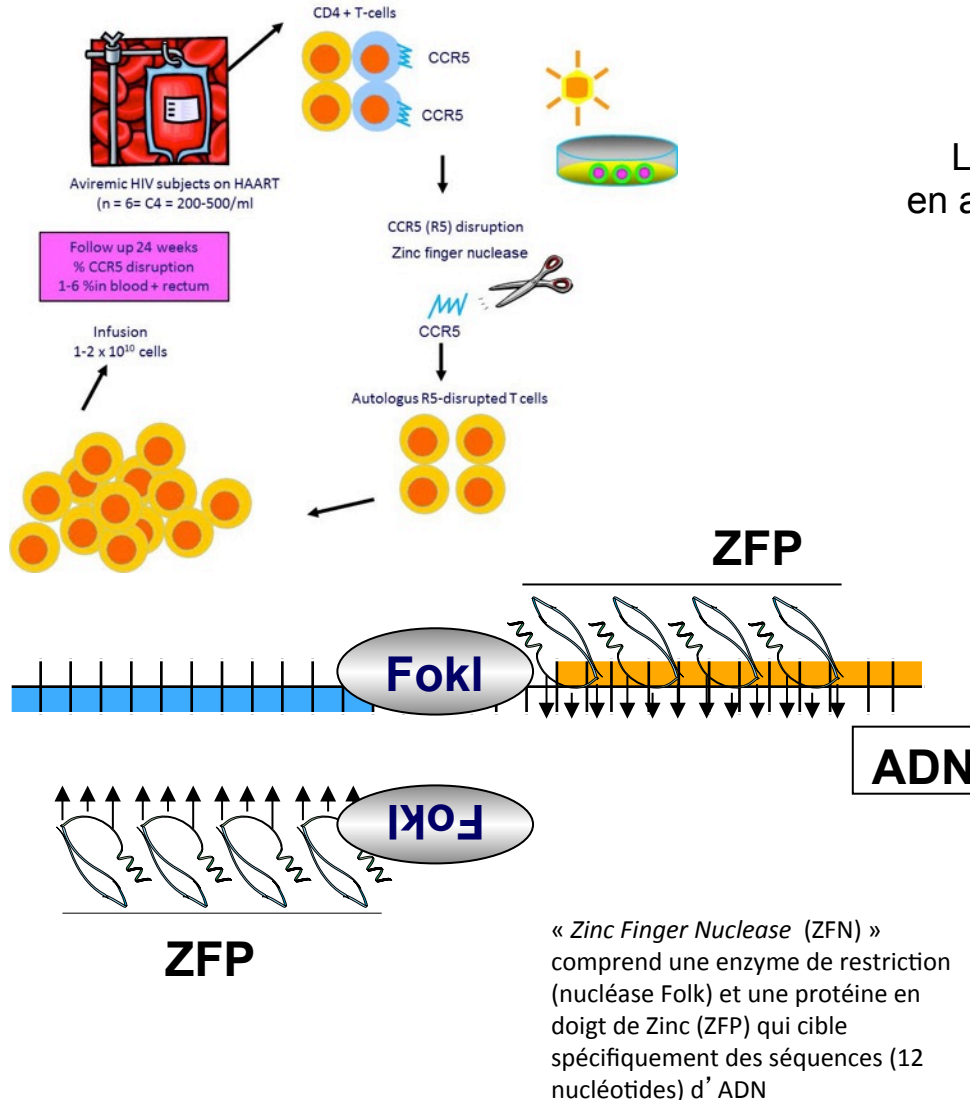


Table 4. Summary of virologic measures.

Sample	Measure	# Labs that tested samples	# Labs with + Test	Consensus	Typical levels in ART-suppressed patient	Fold Difference
Plasma	HIV RNA	4	2 labs (3 samples)	?Intermittent positive, ?<1 copy/ml	1–2 copy/ml	2–20
PBMC	HIV DNA	4	0	Negative (≤ 1 in 10^{6-7})	751 per 10^6 total PBMC [18]	750–7500
PBMC	HIV RNA	3	0	Negative (≤ 1 in 10^{6-7})	66 per 10^6 total PBMC [18]	66–660
Sorted cells from blood	HIV DNA	1	0	Negative	Unknown	
Sorted cells from blood	HIV RNA	1	0	Negative	Unknown	
Peripheral CD4+T	IUPM	2	0	Negative (≤ 1 IU/ 10^{7-9} cells)	1 per 10^6 CD4+T [8,9,11,12]	10–1000
CSF	HIV RNA	2	0	Negative		
CSF cells	HIV DNA	1	0	Negative		
Lymph node	HIV DNA	1	0	Negative	1–12 copies/100 ng [14]	
Lymph Node	HIV RNA	1	0	Negative	≤ 4 log10 copies/g (FDC) [14]	
Rectum (biopsy or cells)	HIV DNA	2	1	?Intermittent positive, <1 in 10^6 cells	777 per 10^6 total gut cells [18]	780
Rectum (biopsy or cells)	HIV RNA	3	0	Negative (<1 in 10^{6-7})	21 per 10^6 total gut cells [18]	21–210
Ileum (biopsy or cells)	HIV DNA	1	0	Negative (≤ 1 in 10^6)	415 per 10^6 total gut cells [18]	415
Ileum (biopsy or cells)	HIV RNA	2	0	Negative (≤ 1 in 10^6)	37 per 10^6 total gut cells [18]	37

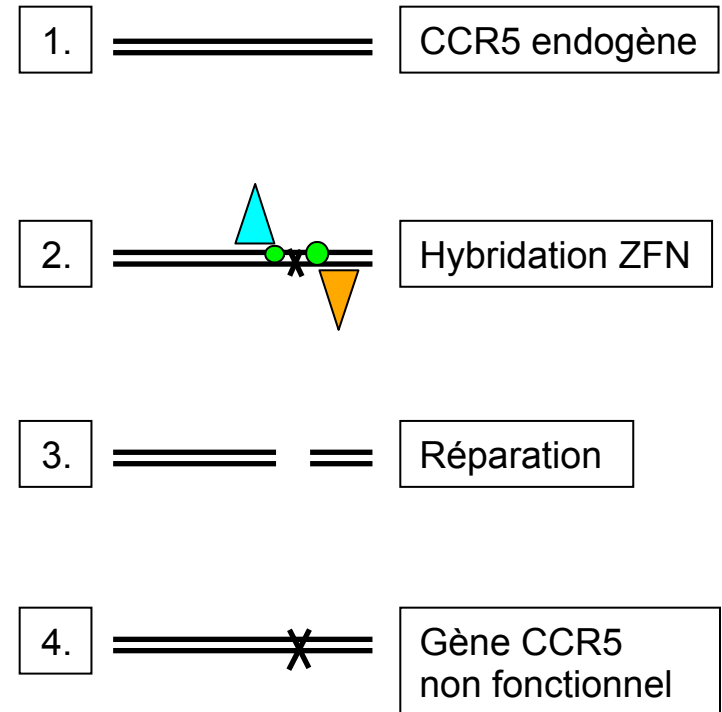
Greffe de cellules CD4+ à CCR5 inactivé

Technologie « Zinc Finger Nuclease »



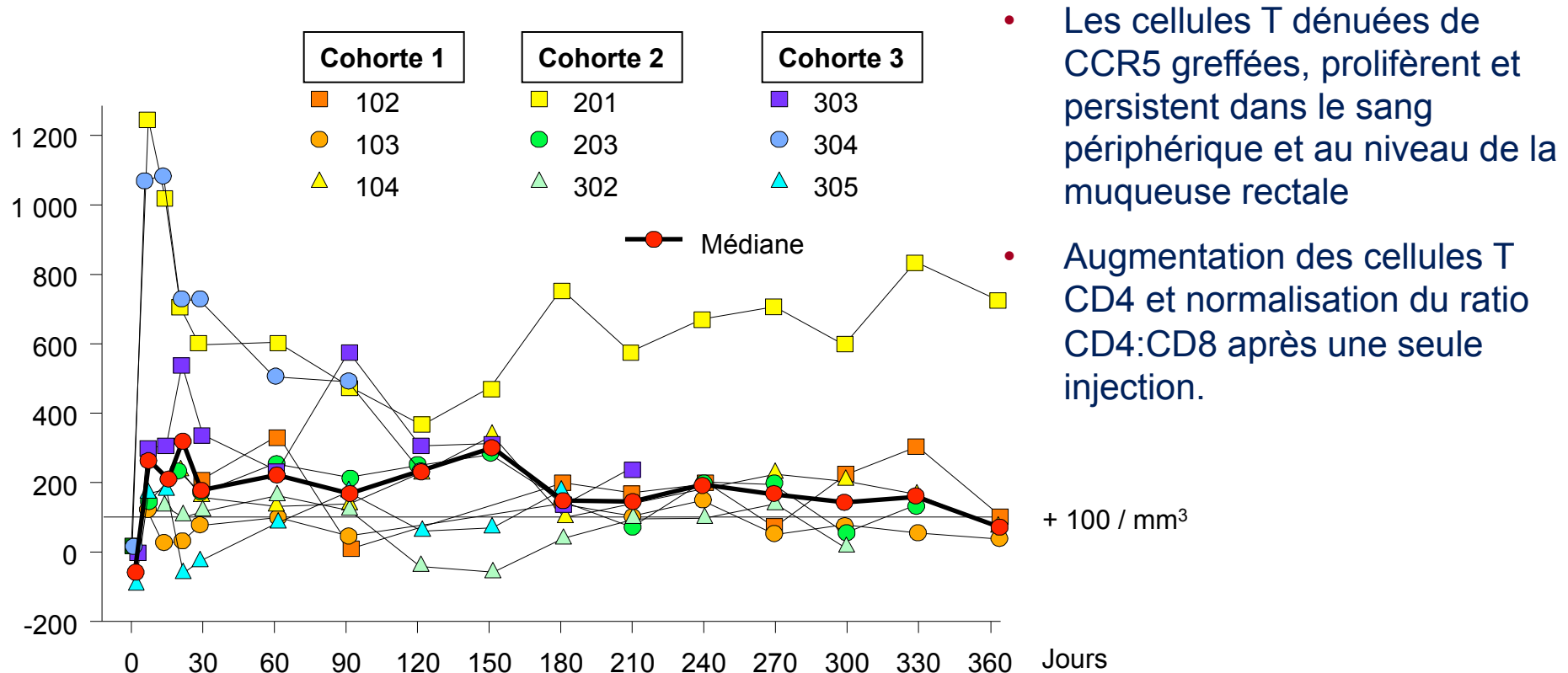
La ZFN va cibler une région du gène CCR5 en amont de celle concernée par la délétion $\Delta 32$

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



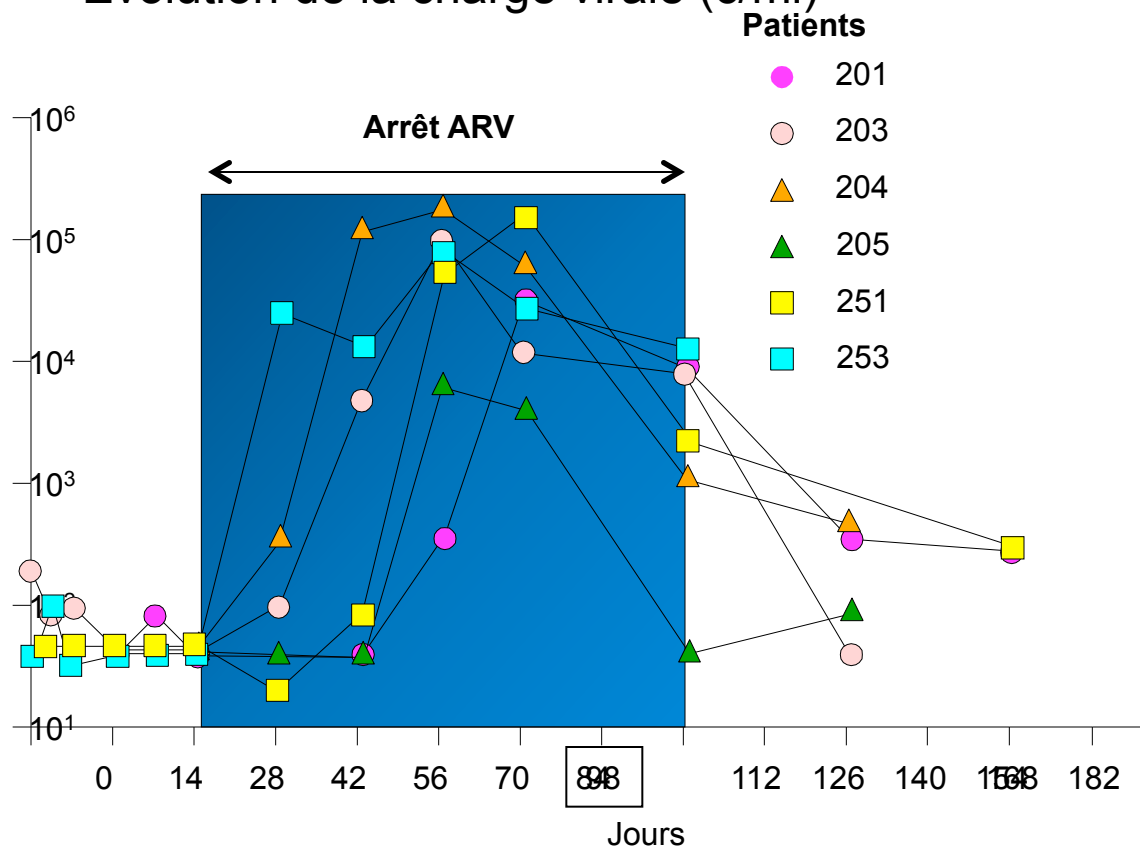
Greffe autologue de cellules CD4+ à CCR5 inactivé chez des patients sous traitement ARV avec CV < 48 c/ml, et CD4 entre 200 et 500/mm³

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

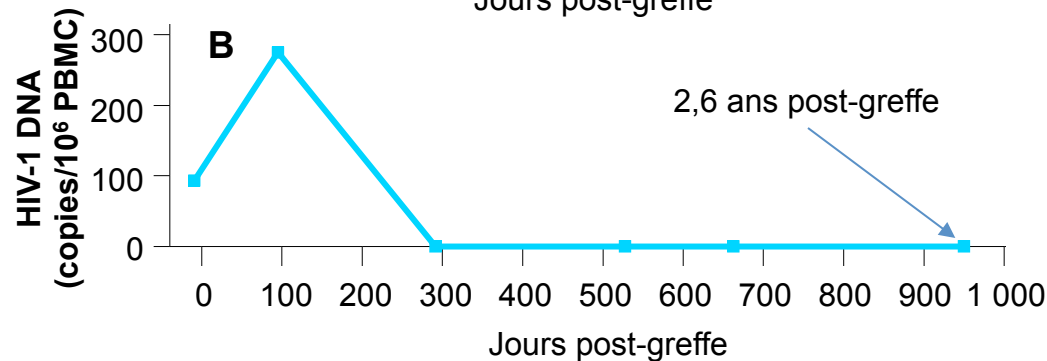
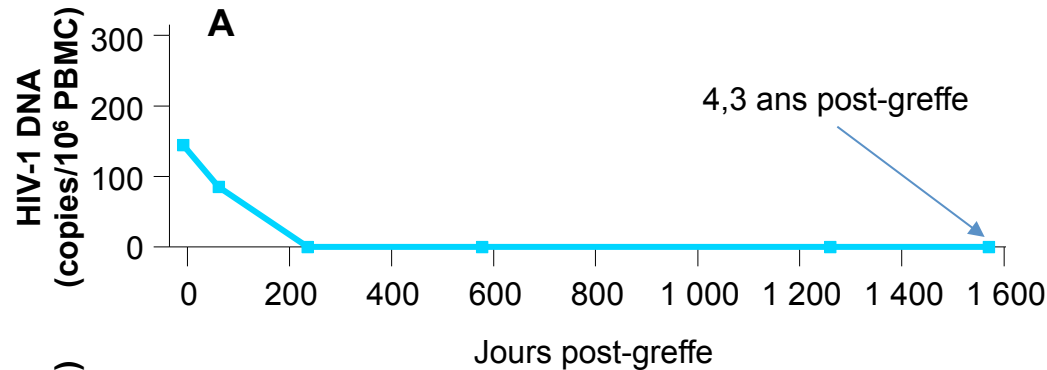
Evolution de la charge virale (c/ml)



- 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

GREFFE ALLOGÉNIQUE ET RÉSERVOIR VIH

Description de 2 cas de greffe allogénique: Impact sur le réservoir viral

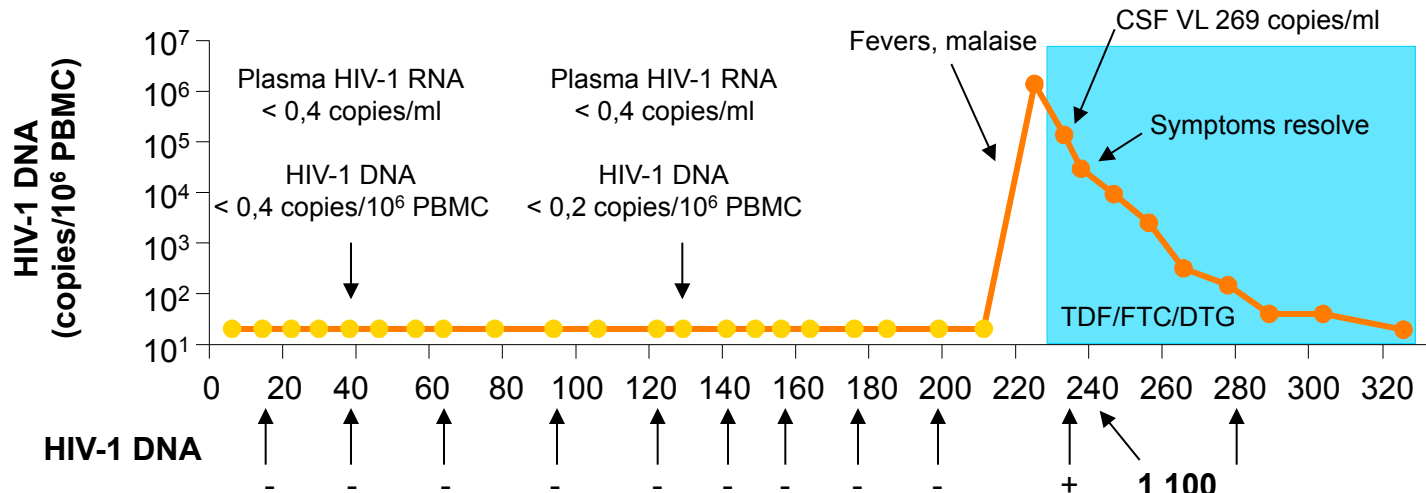
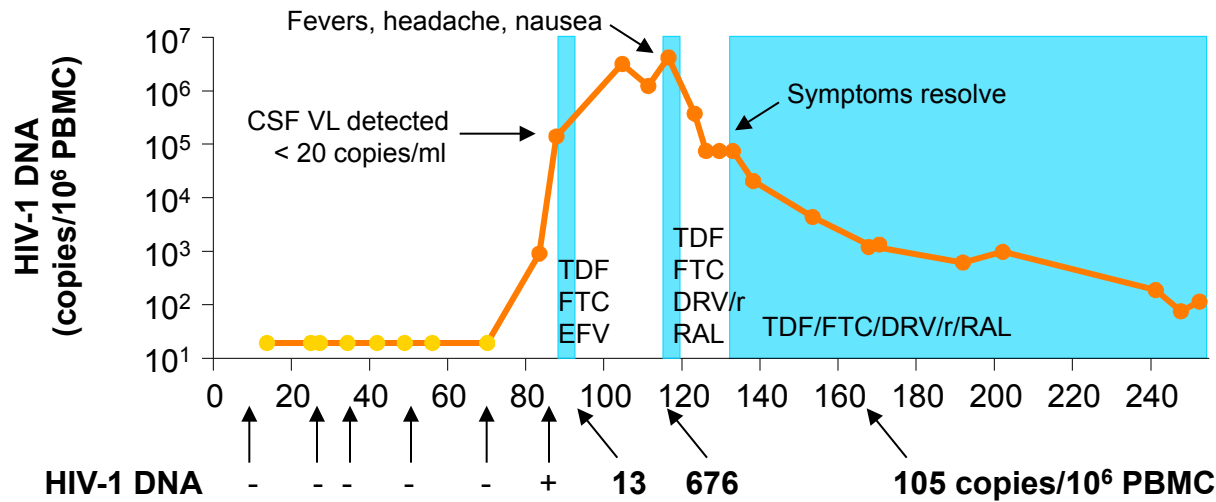


- Pas de détection d'ADN viral dans les PBMC
- Culture négative
- Pas de détection d'ADN viral dans les PBMC
- Culture négative
- Pas de détection d'ADN viral dans les biopsies rectales

- ➔ Pour ces 2 cas: suite à l'allogreffe, au moins 3 log de réduction de l'ADN viral dans les PBMC : <0,001% de PBMC résiduel de l'hôte (effet de la GVH?)
- ➔ Diminution du taux des anticorps et de l'avidité antigénique après la greffe

GREFFE ALLOGÉNIQUE ET RÉSERVOIR VIH

Interruption thérapeutique après greffe allogénique

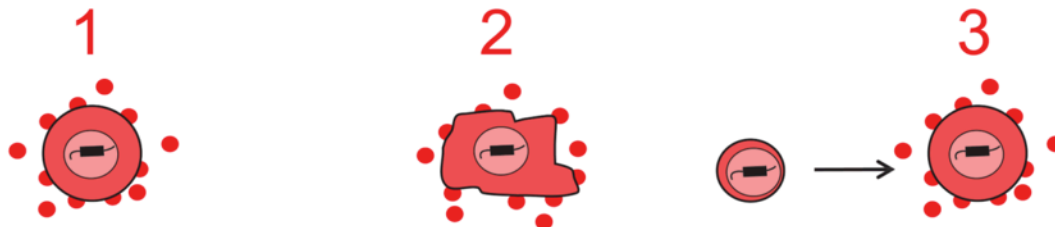
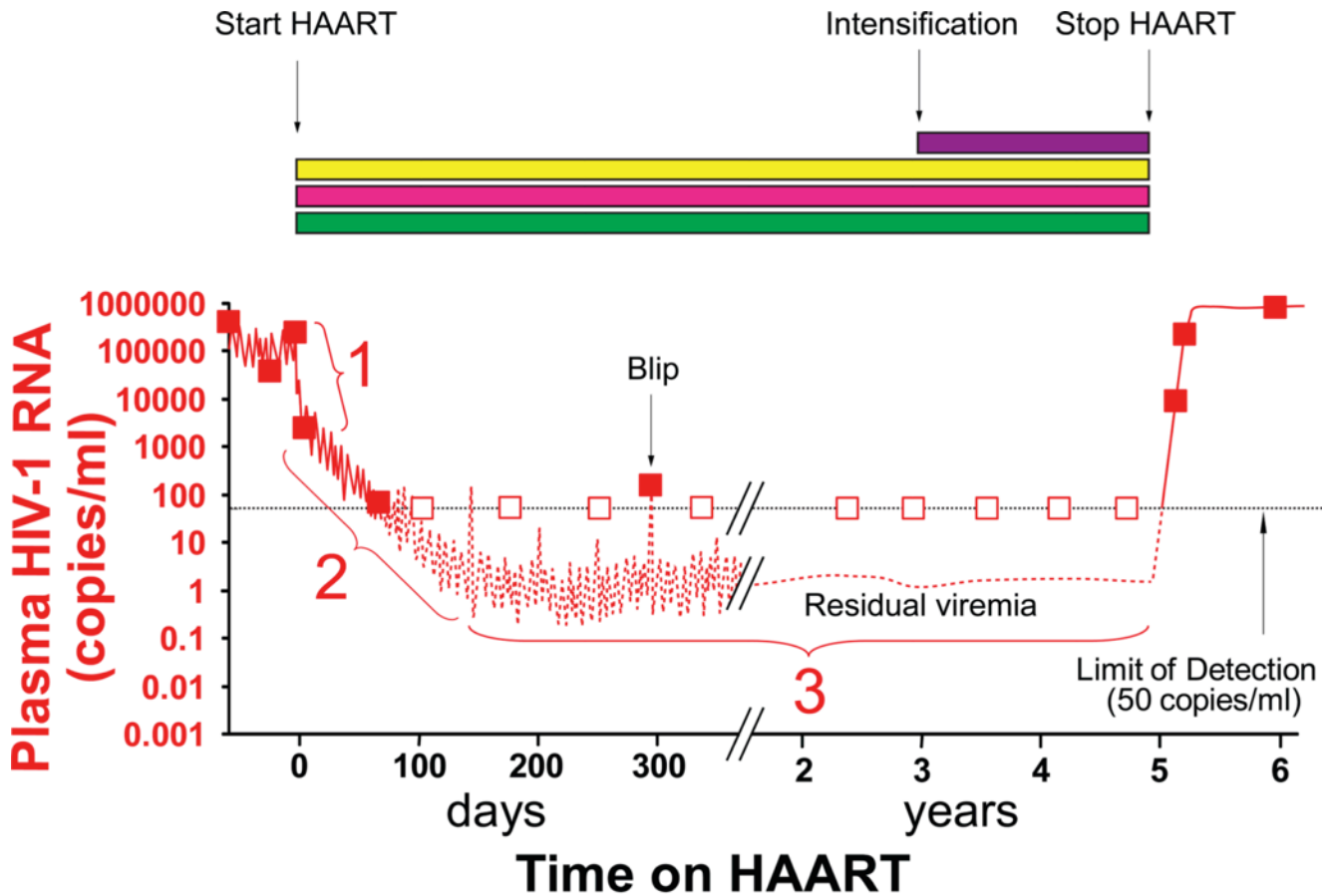


STRATEGIES D'ERADICATION

2- Diminution du réservoir viral

- Intensification ARV
- Intensification ARV + Vaccination thérapeutique
- ARV +/- Intensification + Immunomodulation
- Diminution de l'activation Immune chronique

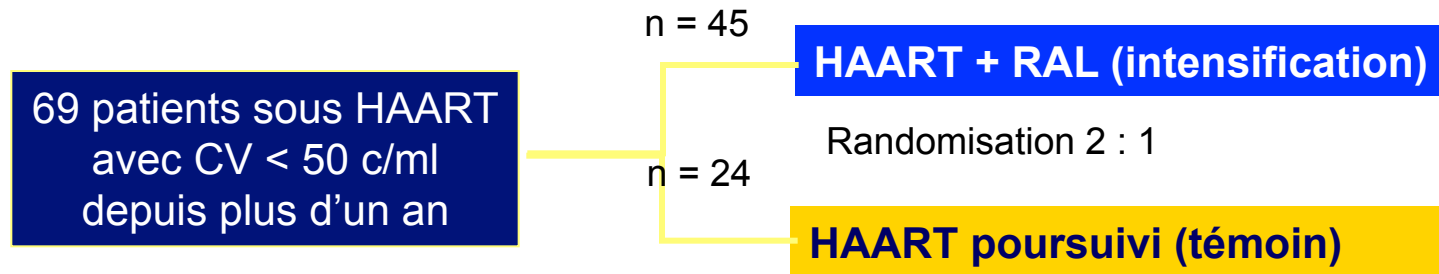
INTENSIFICATION



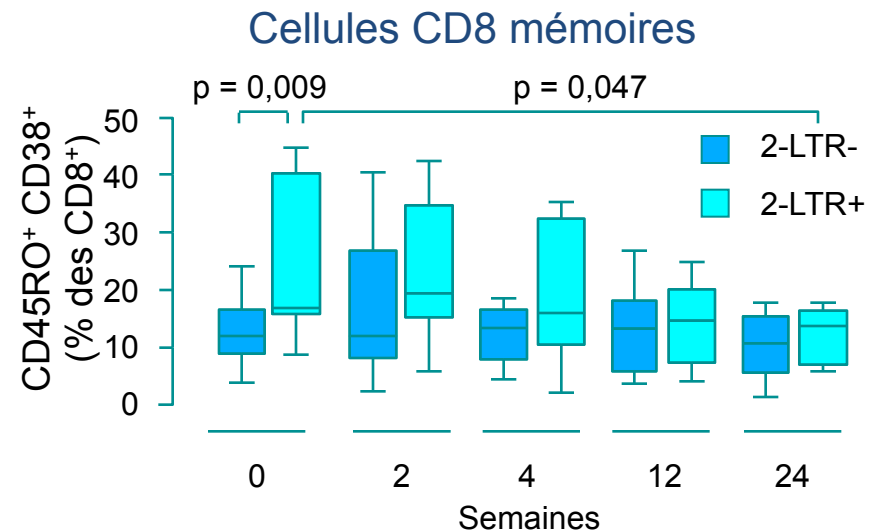
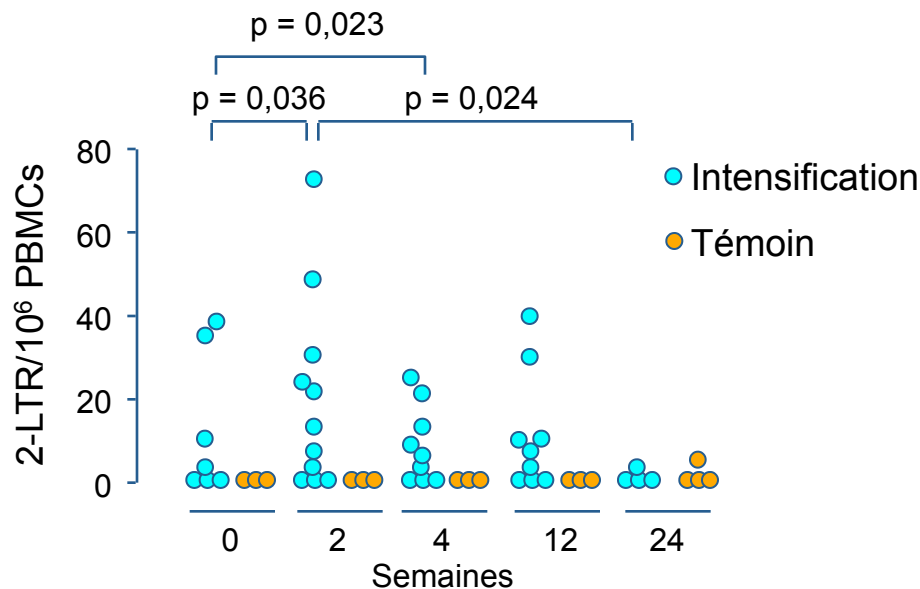
Etudes d'intensification

Référence	Chege D et al. AIDS 2012	Dahl V et al. JID 2011	Byakwaga H et al. JID 2011	Hatano H et al. JID 2011	Yuki SA et al. AIDS 2010	Gandhi RT et al. Plos Med 2010 J AIDS 2011	Buzon MJ et al. Nat Med 2010 Antivir Ther. 2012	McMahon D et al. CID 2010 CID 2012
Randomisation	oui	non	oui	oui	non	oui	oui	non
Nbe semaines RAL	48 (96)	12	24	24	12	12	24 (48)	4
Nbe patients	24	23	75 (4 bras)	30	7	53	69	10
Charge Virale ultra-sensible	na	No change	No change	No change	No change	No change	No change	No change
CV US LCR	na	No change	na	na	na	na	na	na
ADN VIH-1 total (PBMC)	No change	na	na	No change	No change	No change	No change	No change
ADN VIH-1 total (Biopsie)	No change (sigmoïde)	na	na	na	↓ Iléon	na	na	na
CD4	No change	na	No change	No change	na	No change	No change	na
Marqueurs d'activation (cellules CD4, CD8)	na	No change	No change	No change	No change	No change	↓ Activation des CD8	na

Intensification par Raltegravir impact sur la réplication VIH et l'activation immune



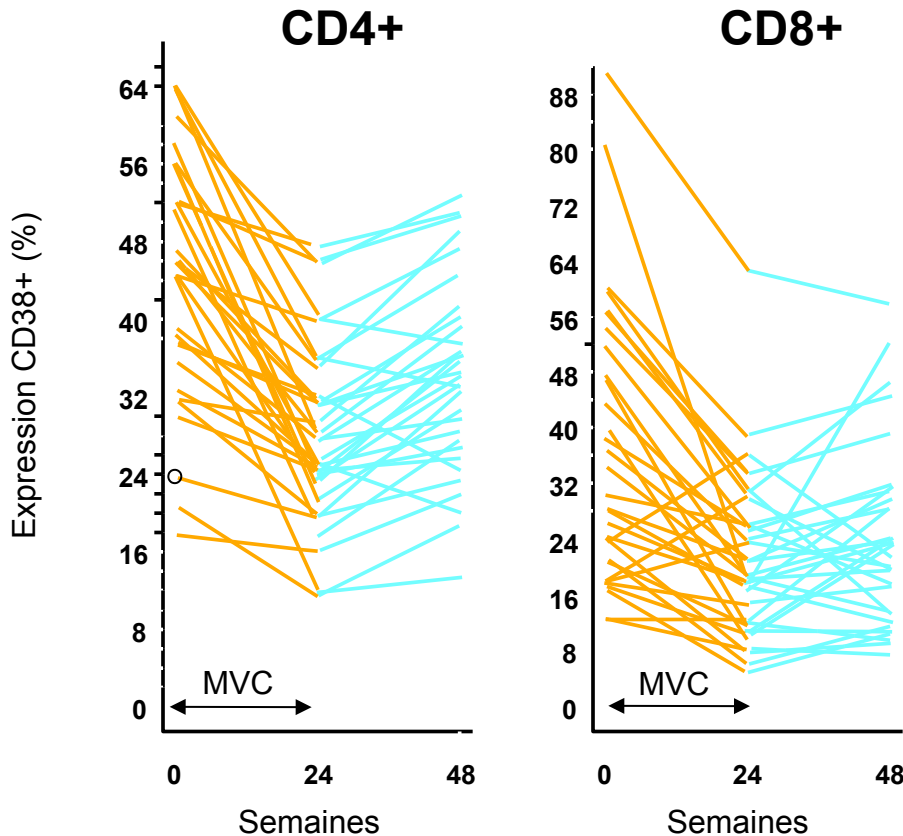
- L'intensification par RAL entraîne chez 29 % (n = 13) une augmentation transitoire de l'ADN épisomal, extra-chromosomique (cercles 2-LTR), traduisant une réplication résiduelle, et ceci plus fréquemment sous IP (8 sous IP parmi les 13 LTR+ vs 6 sous IP parmi les 32 LTR- ; p = 0,01). Chez ces patients avec LTR+, l'activation CD8 est plus importante que chez les patients intensifiés avec cercles 2-LTR indétectables



Essai ACTG A5256 : intensification par MVC

Evolution des CD4 et activation avant et après MVC

- 34 patients sous ARV avec CV indétectable depuis ≥ 4 ans, et CD4 < 250/mm³ et stables (médiane : 153/mm³)
- Addition de MVC pendant 24 semaines



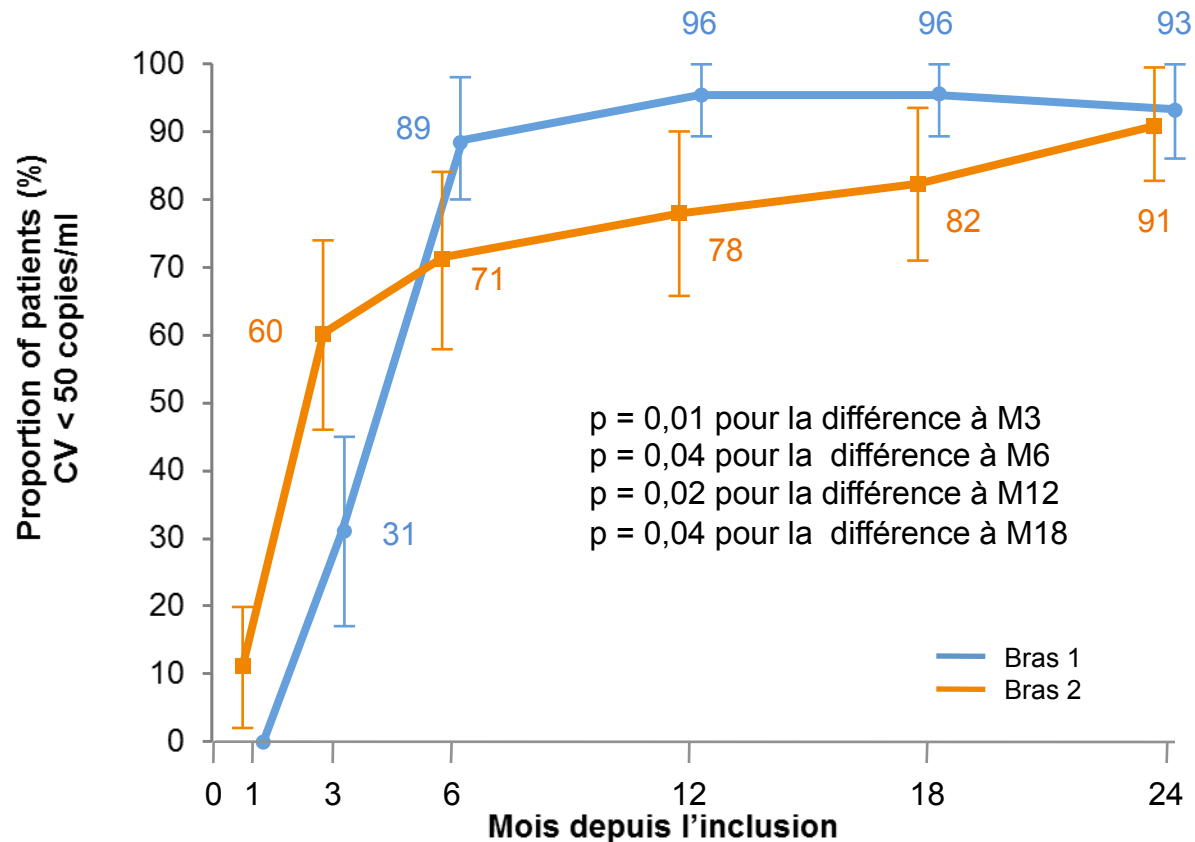
Médiane des Δ S24-J0
- 15 % pour R5 (n = 11)
- 17 % pour R5/X4 (n = 7)

Médiane des Δ S24-J0
- 12 % pour R5 (n = 11)
- 13 % pour R5/X4 (n = 7)

- Evolution médiane des CD4 entre :
 - J0 et S22/24 : + 12/mm³
(+ 8 pour R5 versus + 22 pour X4/R5 et X4, non significatif)
 - S22/24 et S46/48 : + 7/mm³
- Diminution des marqueurs d'activation (% CD38+, % HLA-DR+/CD38+), partiellement réversible après arrêt du MVC

Intensification au cours de la primo-infection

- OPTIPRIM: Effet paradoxal du MVC sur la réplication virale via l'effet immuno-modulateur du MVC



STRATEGIES D'ERADICATION

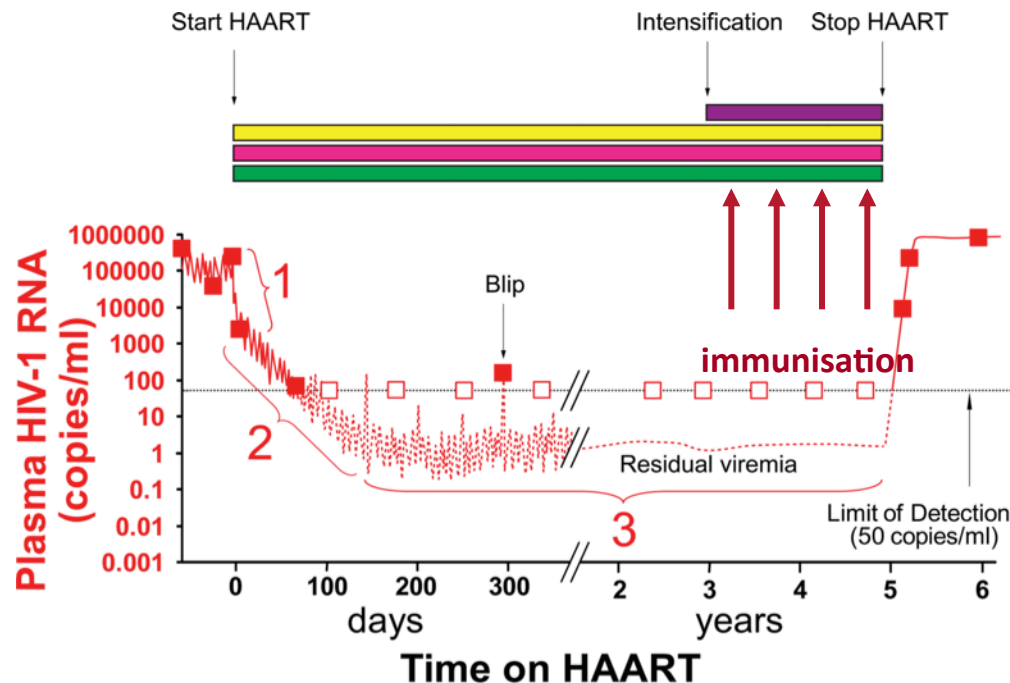
2- Diminution du réservoir viral

- Intensification ARV
- **Intensification ARV + Vaccination thérapeutique**
- ARV +/- Intensification + Immunomodulation
- Diminution de l'activation Immune chronique

INTENSIFICATION + Vaccination Thérapeutique

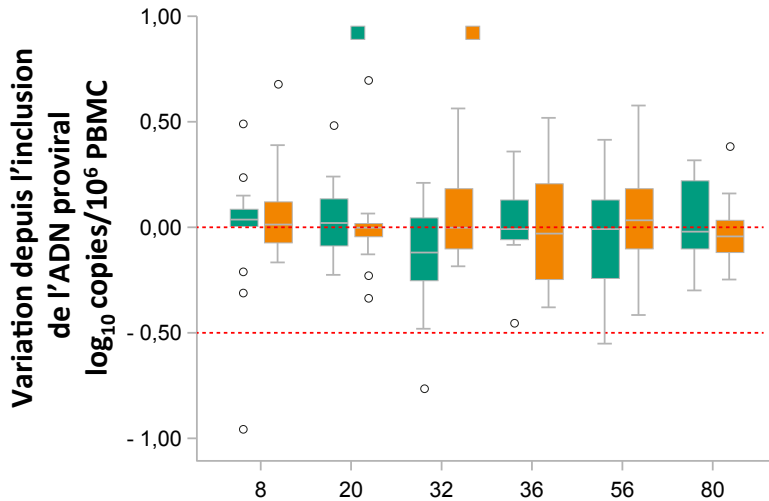
Eramune-2 (vaccin HIV-rAd5)

- **Essai multicentrique, randomisé, non-comparatif**
 - bras intensification par RAL/MVC
 - bras associant intensification et administration du vaccin recombinant adénoviral 5 (HIV-rAd5)
- **Schéma vaccinal** : prime DNA à S8, S12 et S16 suivi du boost rAd5 à S32
- **Inclusion** : 28 patients (14/bras), ARN<50 depuis 2,6 ans, CD4médian =636/mm³, CD8 =672/mm³ et ADN proviral= 170 copies/10⁶ PBMCs
- **Critère principal d'évaluation** : baisse de plus de 0,5 log d'ADN



INTENSIFICATION + Vaccination Thérapeutique

Eramune-2 (vaccin HIV-rAd5)



- **Résultats:** ADN proviral dans les PBMC et dans le tissu rectal : pas de changement significatif au cours du temps
 - 1 seul patient dans le bras intensification (0,55 log₁₀ d'ADN copies/10⁶ PBMCs)
- ➔ **cette stratégie d'intensification thérapeutique avec immunomodulation ne permet pas de réduire le réservoir viral (au niveau sanguin ou au niveau tissulaire)**

BUT:

Induction de CTL dirigés contre des épitopes conservés immunodominants, présentés par plusieurs allèles HLA différents

Mais...

- Pas d'éradication du réservoir latent, puisque ces cellules ne produisent pas de protéine virale et ne sont donc pas visibles par le système immunitaire
- La stimulation immune continue (réplication virale) conduit à l'anergie et à l'épuisement immunitaire...en rajouter?

➔ **Chez patients à CV indétectable, stratégie en association avec une activation sélective du réservoir latent ...**

STRATEGIES D'ERADICATION

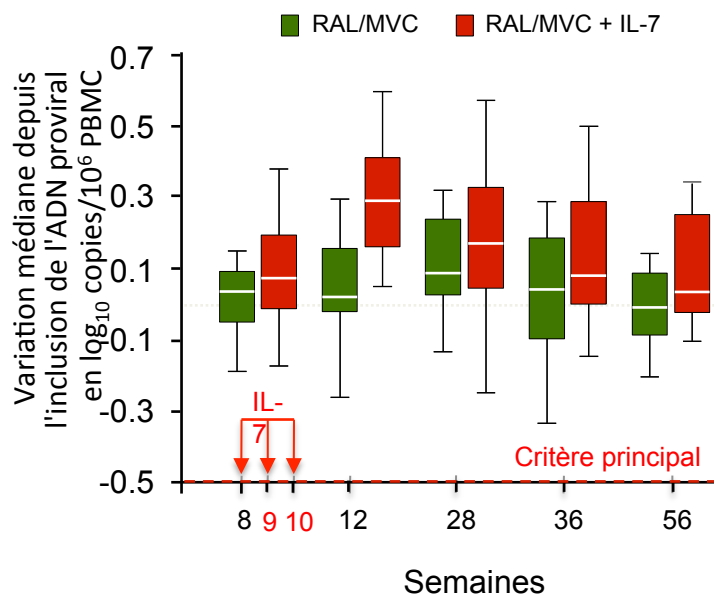
2- Diminution du réservoir viral

- Intensification ARV
- Intensification ARV + Vaccination thérapeutique
- **ARV +/- Intensification + Immunomodulation**
- Diminution de l'activation Immune chronique

INTENSIFICATION + Immunomodulation

ERAMUNE-01 : RAL + MVC ± IL-7

- Étude randomisée non-comparative réalisée chez des patients indétectables sous ARV (CV < 50 c./ml), CD4 > 350/mm³ et ADN proviral : 10-1 000 copies/10⁶ PBMC
 - 8 semaines d'intensification par RAL/MVC puis double intensification **RAL/MVC + IL7** (3 injections r-hIL-7 à S 8, 9 et 10) ou RAL/MVC seul (15 pts/bras)
 - Réponse définie par au moins une diminution de l'ADN proviral > 0,5 log à S56



Résultats à 1 an :

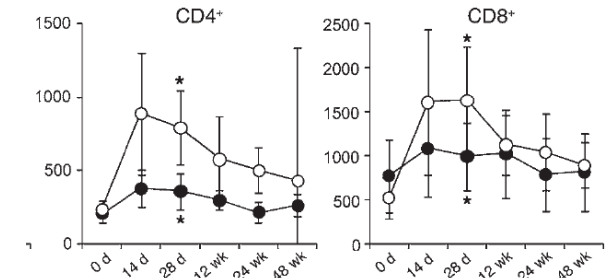
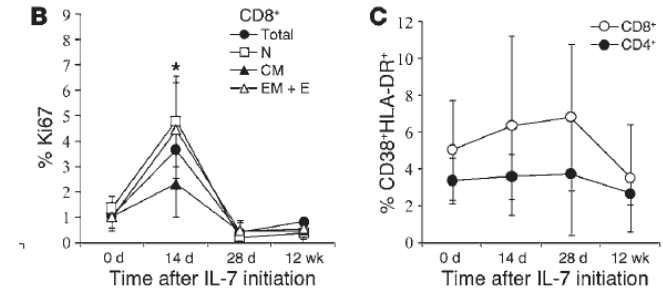
- IL-7 induit une forte augmentation transitoire des CD4, notamment des cellules centrales mémoires (CM)
- Aucune diminution du réservoir viral dans aucun des 2 bras de traitement**
- Etude du réservoir dans le bras IL-7: **augmentation significative de l'infection** des cellules mémoires (TM et TCM), déjà observé in vitro (avec production virale).

IL-7 pour diminuer le réservoir? NON

IL-7 dans les stratégies d'éradication ?

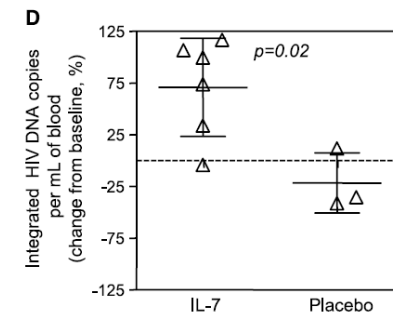
Patients infectés, traités et avirémiques

- Rupture de la latence virale ?
 - Réactivation de l'ADN proviral via JAK/stat5
 - Blips de réplication sous IL-7
 - Les virus détectés pendant les blips sous IL-7 sont identiques aux virus avant et après l'administration d'IL-7
- Augmentation des réponses T CD4 anti-VIH
- Augmentation de la différenciation des CTL



MAIS dans le contexte IL-7 + HAART conventionnelle:

- Augmentation des réservoirs par prolifération cellulaire en favorisant l'homéostasie des CD4+TCM latents (IL-7 > IL-15)
 - IL-7: prolifération des T_N et T_{CM}
 - IL-15: prolifération des T_{EM} et T_{TM}
- Expansion du pool de CD4+ infectés et non infectés



Vandergeeten C et al. Blood 2013

Wang JCI 2005, Imamichi, AIDS 2011; Chaumont Nat Med 2009; Levy J Clin Invest 2009; Levy, JCI 2009 Levy, CID 2012

STRATEGIES D'ERADICATION

2- Diminution du réservoir viral

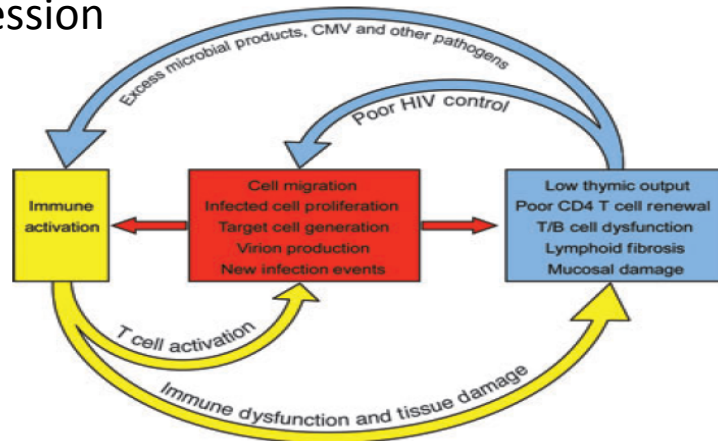
- Intensification ARV
- Intensification ARV + Vaccination thérapeutique
- ARV +/- Intensification + Immunomodulation
- **Diminution de l'activation Immune chronique**

Role de l'activation Immune dans le maintien du réservoir sous ARV

- Taille estimée du réservoir sous ARV = directement associée à la fréquence des cellules activées et prolifératives (environnement immun inflammatoire)
- Les cellules activées et prolifératives sont enrichies en VIH-1

Activation T → Stabilité du réservoir

- Transfert du virus cellule à cellule (plus sensibles à l'infection)
- Stimulation de la prolifération CD4⁺ T et de l'expansion de la population de cellules infectées (par les cytokines [e.g., IL-7] en + de l'engagement du TCR par les Ag spécifiques)
- Stimulation des réponses immuno-régulatrices (Treg et up-régulation PD-1, CTLA-4...) qui empêchent la génération d'une RI optimale spécifique VIH
- Stimulation du dépôt de collagène dans les organes lymphoïdes Ilre -> fibrose, persistance de l'immuno-Dépression



Les interventions thérapeutiques qui ciblent l'activation et /ou la prolifération cellulaire peuvent avoir un impact sur le réservoir.

Role de l'activation Immune dans le maintien du réservoir sous ARV

Table 1. Anti-Inflammatory Agents for Management of Antiretroviral-Treated HIV Disease

Target	Drug or Intervention	
residual or cryptic HIV replication	treatment intensification, optimized antiretroviral drug tissue penetration, novel antiretroviral drugs	
excess copathogen burden	valacyclovir (HSV), valganciclovir (CMV), HCV cure	
microbial translocation	sevelamer, rifaximin, mesalamine, isotretinoin, prebiotics, probiotics, colostrum	→ Ttt additif prévention des comorbidités
poor T cell function	interleukin-7, growth hormone, anti-PD1 antibodies	
lymphoid and tissue fibrosis	perfenidone, ACE inhibitors, angiotensin II receptor blockers	
chronic inflammation	HMG CoA reductase inhibitors ("statins"), chloroquine, hydroxychloroquine, celecoxib (COX-2 inhibitors), aspirin, methotrexate, lenalidomide, leflunomide, ruxolitinib (JAK inhibitors), sirolimus (mTOR inhibitors), IDO inhibitors, anti-interferon-alpha antibodies, anti-IL-6 antibodies, anti-IL-1-beta antibodies	
hypercoagulation	aspirin, apixaban, dabigatran	→ Ttt additif prévention des comorbidités
cellular aging	sirtuin activators, sirolimus	
metabolic syndrome, obesity	metformin, exercise, diet, vitamin D	

Drugs aimed at reversing inflammation or its immediate consequences in antiretroviral-treated HIV infection are listed. Those drugs in more advanced stages of development (phase I/II) are listed first, followed by those that are still in development.

- **Rapamycin** (inhibiteur de mTOR, sirolimus): blocage du cycle G1→S dans cellules activées, diminution de l'expression de CCR5 → essai en cours en combinaison ds les stratégies d'éradication
 - Diminution de réservoir viral (ADN) chez les patients VIH greffés recevant du sirolimus en prévention du rejet de greffe
- **IFNα** à dose supra-thérapeutiques: effets anti-VIH et diminution du réservoir
- **Inhibition de l'IFNα** (modèle murin): diminution de l'activation immune, l'activité PD1/PD1-L, IL-10, restauration de l'architecture des organes lymphoïdes, augmentation des CD4+, et de la clairance virale
...effets « balance d'équilibre» difficile à prévoir...

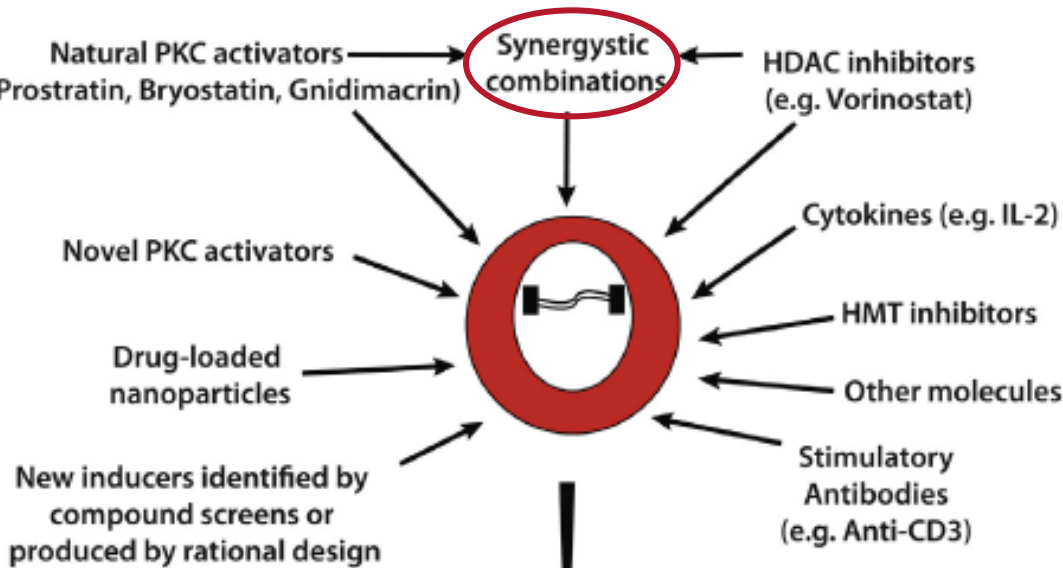
Intérêt des stratégies anti-inflammatoires ? La compréhension des causes de l'inflammation persistante est importante pour prévenir les morbidités non liées au VIH et pour définir les stratégies d'éradication.

STRATEGIES D'ERADICATION

3- Réversion de la latence virale: Shock and Kill

- **Shock:** réactivation pharmacologique du VIH latent (ex: inhibiteurs HDAC)
 - Production virale
 - Mort des cellules par ECP ou mécanismes de clairance de l'hôte (Système Immunitaire)
 - Ne pas induire une activation généralisée
 - Ciblage de toutes les populations de cellules infectées?
 - Eviter l'infection de nouvelles cellules après réactivation?
 - Plusieurs cycles de traitement? → traitement non toxique pour une administration répétée
- **Kill:** Augmentation des mécanismes de défense de l'hôte → Immunothérapies
 - Développement de processus auto-immuns?

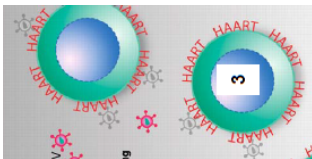
Induce latently-infected cell to produce viral proteins



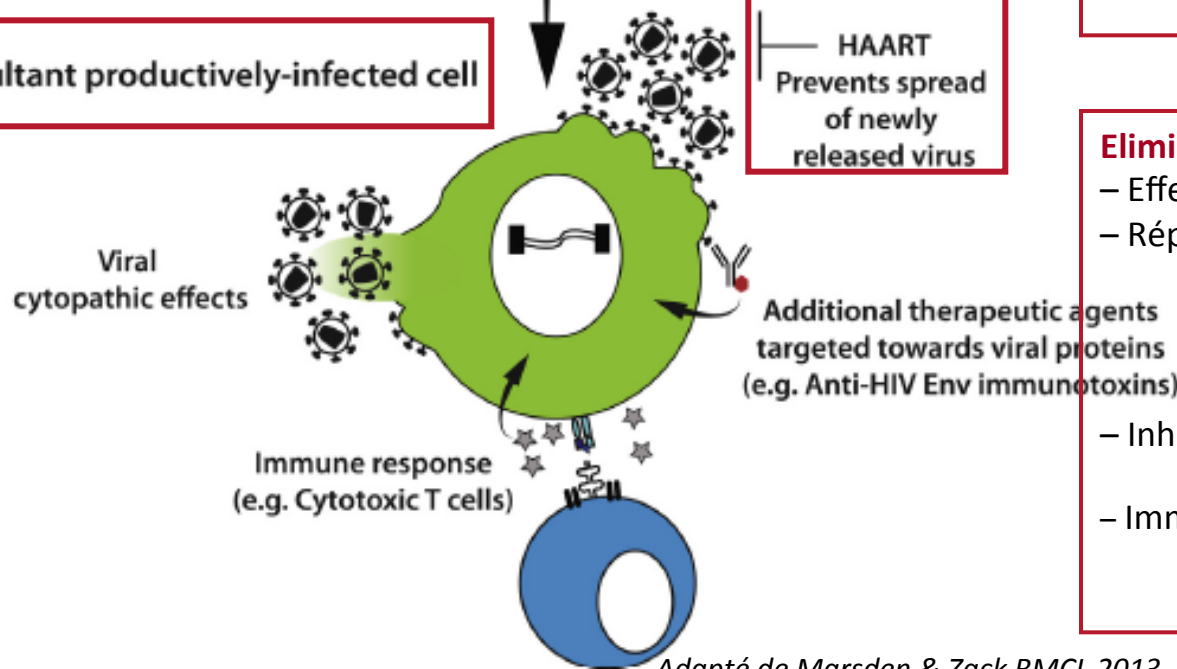
Induction de la transcription du provirus latent: Rendre les cellules visibles par le système immunitaire

- HDAC inhibitors (SAHA, Romidepsin)
- PKC activators (NFKB)
- BRD4 inhibitors
- Activation élongation ARNm VIH (PTEF-b)
- HTS (NCEs)

**Eviter l'infection de nouvelles cellules
→ HAART +/- intensification**



Kill resultant productively-infected cell



Eliminer les cellules produisant le virus

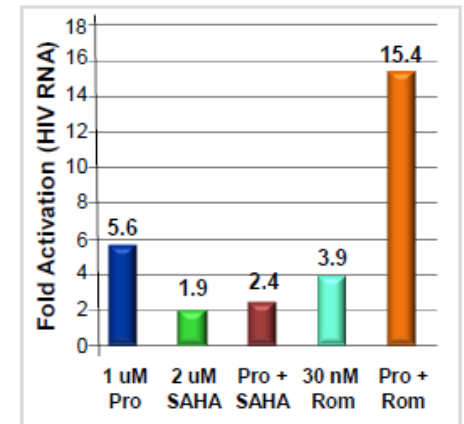
- Effets cytopathiques du virus ...
- Réponses Immunes spécifiques
 - Therapeutic vaccines → CD8+
 - HIV mAbs (ADCC, Phagocytosis)
 - Ac Neutralisants
 - Toxines, Radio-Immuno-Therapy
- Inhibition des « Immune Checkpoints »
 - Anti-PD1, Anti-PDL1
- Immune modulators
 - TLR7 Agonists

SHOCK: Réactiver l'expression des gènes du VIH

- **Etudes exploratoires:** IL-2 or IL-2 + Ac anti-CD3 : **ECHEC** de l'éradication, pas d'élimination du réservoir et → Toxicité due à l'activation cellulaire T globale.
- **Méthodes plus sélectives:** molécules qui réactivent le virus latent sans entraîner d'activation cellulaire T globale ... en attendant ECP ou RI de l'hôte qui élimine les cellules latentes réactivées?

3 molécules approuvées FDA:

- Inhibiteurs HDAC: Vorinostat [K] (SAHA), Romidepsin
- Acide Valproïque (+ diminution du réservoir latent démontré)
- Disulfiram (inh. Acétylate déshydrogénase, activation voie signalisation Akt): réactivation virus latent ds modèles cellulaires issus de patients.
- Activateur de la Protéine Kinase C (PKC) via NFκB
prostratin [K, synergie inh. HDAC]), bryostatin [K]
- Autres Inhibiteurs HDAC
 - panobinostat
 - Synergie Inh. HDAC + Activateur PKC
- Histones et DNA méthyltransférases
- Inhibiteurs de Protéines du bromodomaine (inhibiteur de BRD4)



→ en cours d'investigation

SHOCK: Réactiver l'expression des gènes du VIH

Inhibiteurs d'HDAC, Ex:Vorinostat (SAHA)

- In vitro: Puissant inducteur de l'expression et de la production virale dans les cellules T CD4+ au repos (40 fois plus puissant que l'acide valproïque)

- Patients traités (n=8), VL < 50 depuis au moins 6 mois et CD4 > 300/mm³
 - Administration d'une dose unique orale de 400 mg de VOR

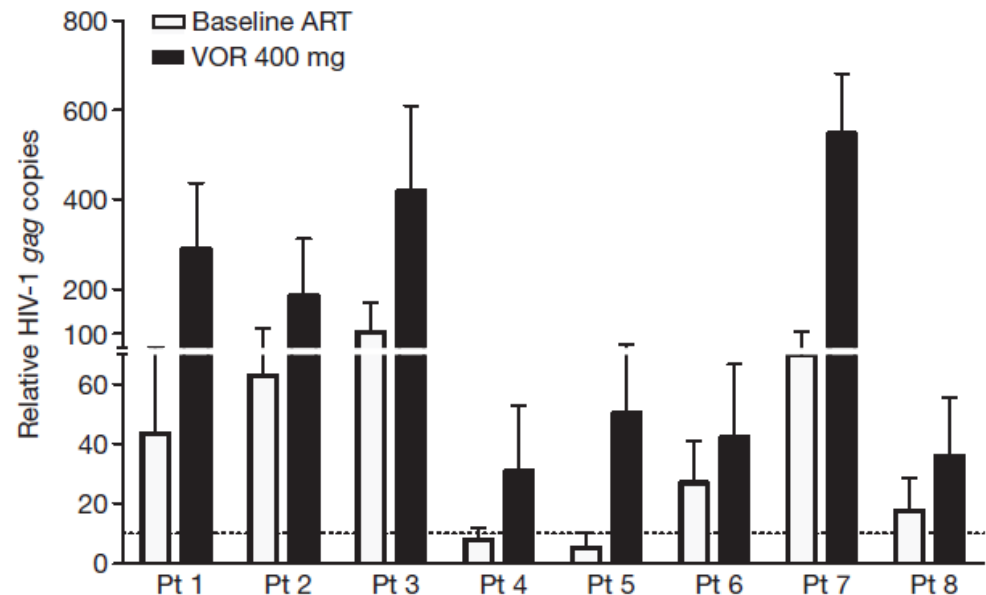
- Mesure de l'ARN-VIH gag non épissé dans les cellules CD4 au repos
X 1.5 – 10 (mean: 4.8) de l'expression des ARN-VIH non épissés dans les CD4 "au repos"

- **mutagène...** exposition prolongée?

Administration of vorinostat disrupts HIV-1 latency in patients on antiretroviral therapy

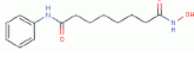
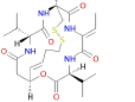
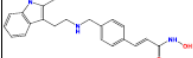
N. M. Archin¹, A. L. Liberty¹, A. D. Kashuba¹, S. K. Choudhary¹, J. D. Kuruc¹, A. M. Crooks¹, D. C. Parker¹, E. M. Anderson², M. F. Kearney², M. C. Strain³, D. D. Richman³, M. G. Hudgens¹, R. J. Bosch⁴, J. M. Coffin², J. J. Eron¹, D. J. Hazuda⁵ & D. M. Margolis¹

| NATURE | VOL 487 | 26 JULY 2012



SHOCK: Réactiver l'expression des gènes du VIH

HDACis Selected for Testing in HIV+ Subjects on ART

	Vorinostat SAHA (Merck)	Romidepsin (Celgene)	Panobinostat (Novartis)
Structure			
Regulatory Status	FDA Approved	FDA Approved	Phase 3
Indication	CTCL	CTCL	MM/AML
Dose	400 mg QD PO	14 mg/m ² IV Days 1, 8, 15 (28 day cycle)	20mg TIW PO
Clinical studies in HIV+ Subjects	Underway (US & Australia)	Clinical protocol development (US-ACTG)	Underway (Denmark)
Dose / Duration	400mg (single & 14 days)	< 14 mg/m ² SAD	20mg TIW every other week / 8 weeks

Summary of HDACis in Clinical Testing

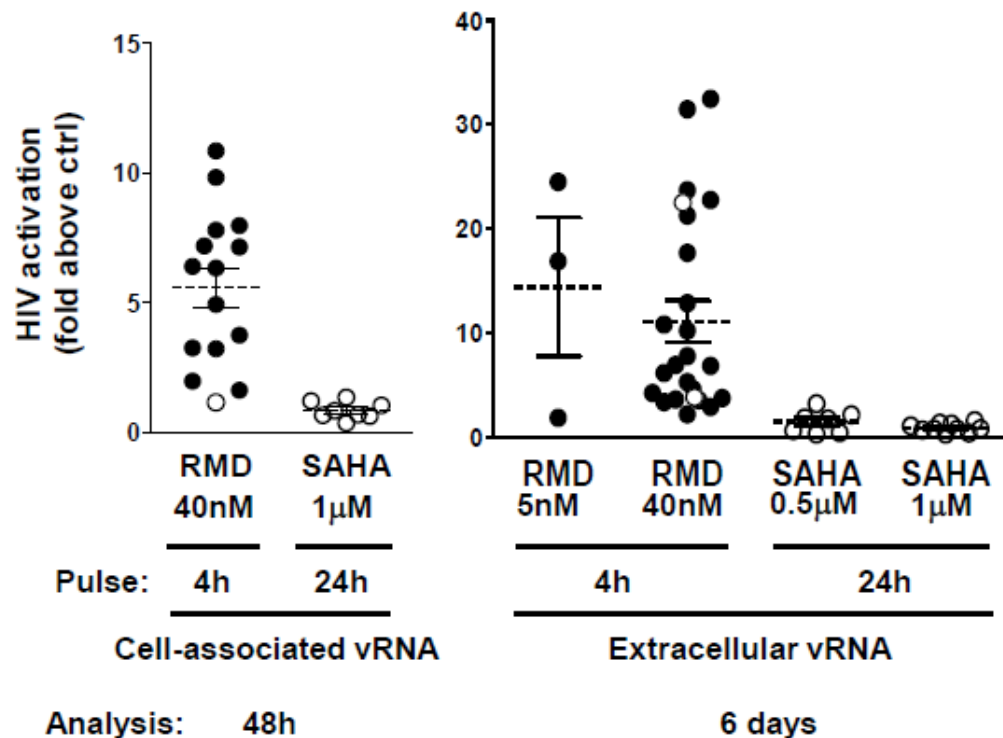
	Vorinostat SAHA (Merck)	Romidepsin (Celgene)	Panobinostat (Novartis)
Route of Administration	Oral	Intravenous	Oral
DDIs with ARVs	Minimal	Yes	Minimal
Ames Test (Mutagenicity)	Yes	No	Yes
Potency to Reactivate HIV (<i>in vitro</i>)	Low	High	High
Human Exposure/ EC ₅₀ for HIV Activation	0.1	11	2
<i>Ex vivo</i> HIV activation (patient cells)	Yes	Yes	Yes
<i>In vivo</i> HIV activation	Yes	???	Yes

SHOCK: Réactiver l'expression des gènes du VIH

Ex Vivo HIV Activation by RMD and SAHA

romidepsin

Memory CD4+ T-cells (Leucopak): Pulse Treatment



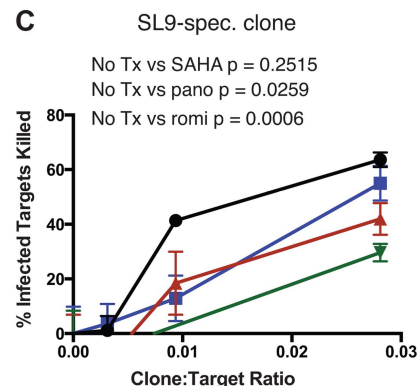
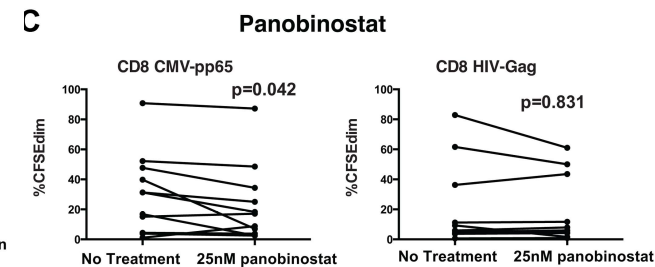
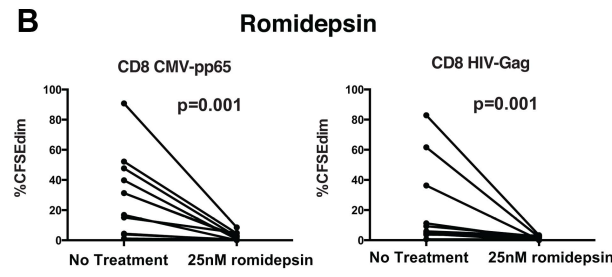
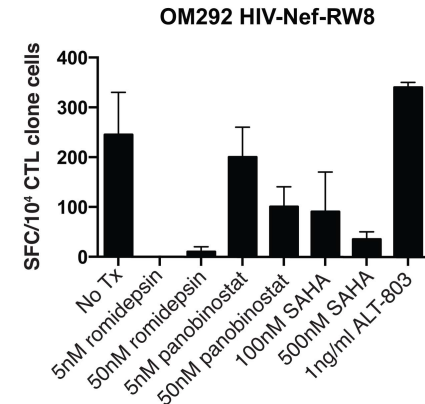
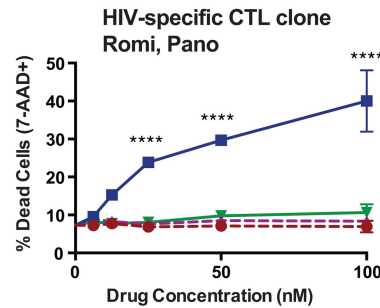
Relative to clinical exposures: 5 – 40 nM RMD (5 – 40%), SAHA 0.5 – 1 μM (100 – 200%)

Histone Deacetylase Inhibitors Impair the Elimination of HIV-Infected Cells by Cytotoxic T-Lymphocytes

Richard Brad Jones^{1,2}, Rachel O'Connor¹, Stefanie Mueller^{1,2}, Maria Foley^{2,3}, Gregory L. Szeto^{2,3}, Dan Karel¹, Mathias Lichterfeld⁴, Colin Kovacs^{5,6}, Mario A. Ostrowski^{5,6,7}, Alicja Trocha¹, Darrell J. Irvine^{1,2,3,8}, Bruce D. Walker^{1,4,8*}

August 2014 | Volume 10 | Issue 8 |

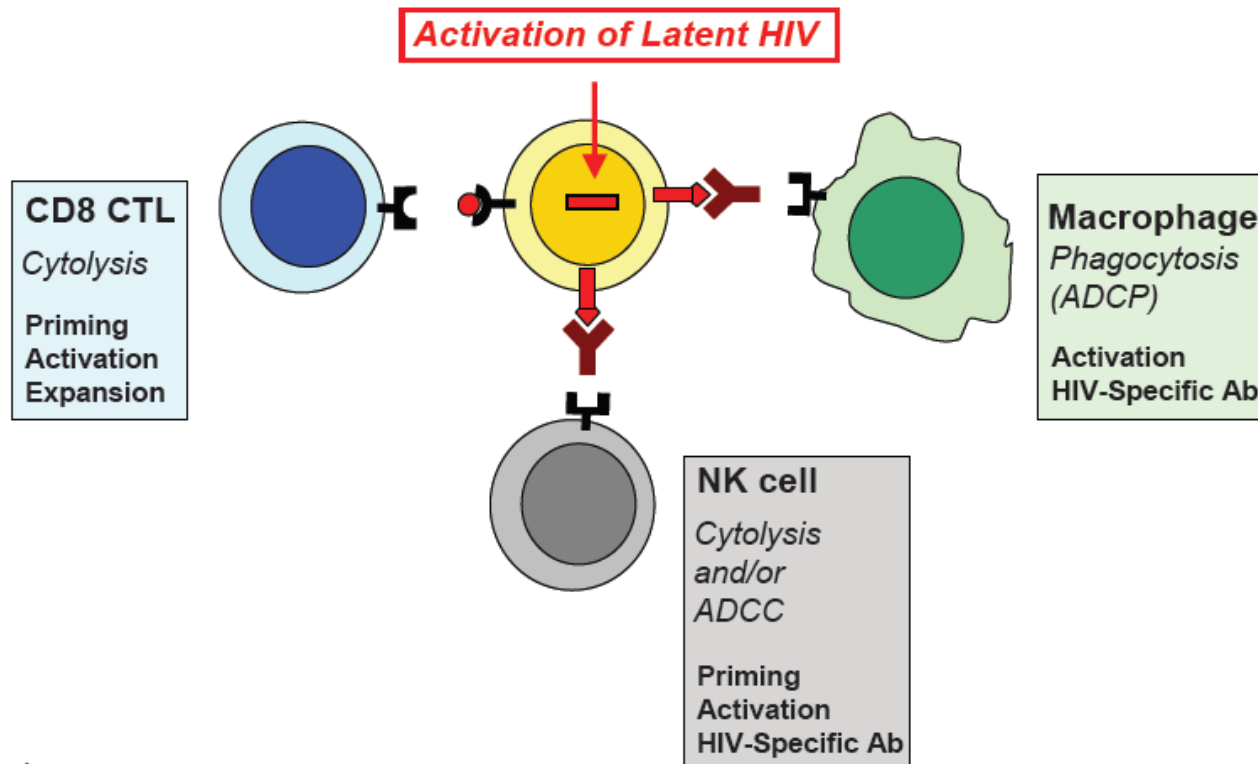
- Romidepsin and Panobinostat are toxic to activated T-Cells, including CTL clones
- HDAC Inhibitors exert rapid and durable Suppression of IFN- γ production from HIV-Specific-Stimulated CD8+ T-Cells
- HDAC Inhibitors differentially impair proliferation of VIH-Specific CD8+ T-cells (HIV-Gag- and CMV-pp65-specific CD8+) and CD4+ T-cells
- HDAC Inhibitors impair CTL killing of HIV-Infected CD4+ target cells



HDACis can exert negative effects on the CTL that may be needed for flush-and-kill approaches to eradication.

STRATEGIES D'ERADICATION: KILL

Immune-Mediated Killing of Infected Cells Expressing Reactivated HIV



Slide 4

Puisque Effet Cyto-Pathogène du virus insuffisant pour détruire les cellules latentes réactivées

→ Boost du système immunitaire

STRATEGIES D'ERADICATION

SHOCK and KILL

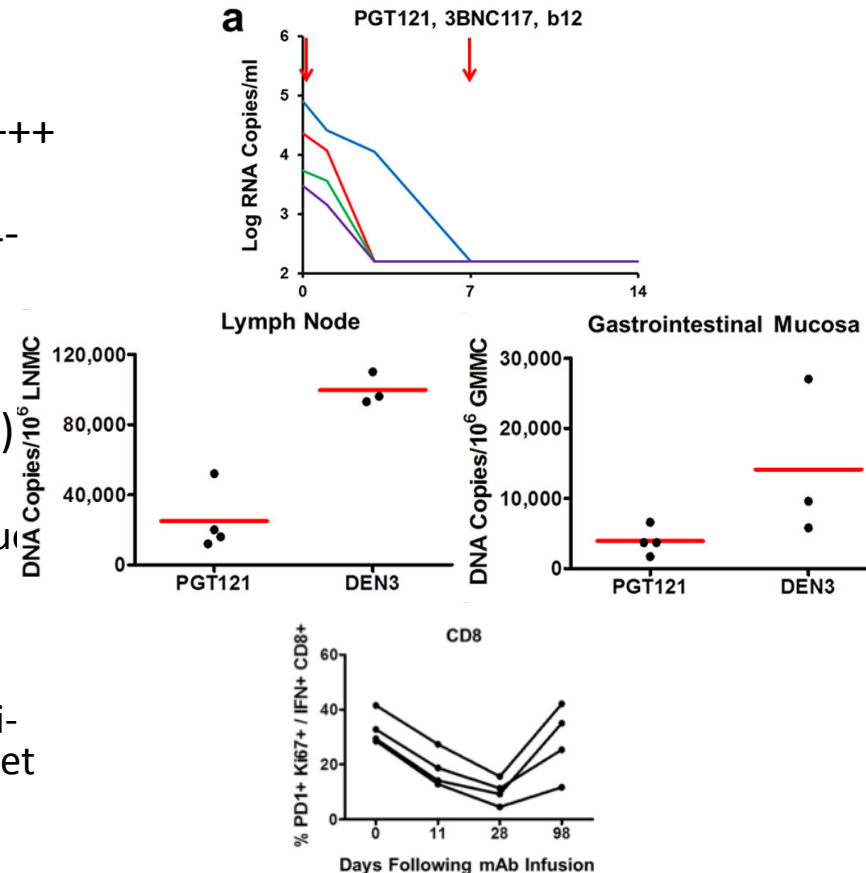
Anticorps spécifiques

- Ac Neutralisants
- Radio-immunothérapie



Ac Neutralisants et Eradication Virale

- **mAbs Nt 1ère génération**: inefficace (études pré-cliniques et cliniques), peu de contrôle de la virémie et émergence de résistance
 - **mAbs nouvelle génération** (isolés à partir de patients): puissance +++ et reconnaissance large+++ des épitopes + injection de **cocktail de mAbs**
 - Différentes régions de l'enveloppe HIV-1 : CD4-binding site, V1/V2, V3, V4, gp41
 - **Expérience sur macaques** infectés chronique avec SHIV : 2 cycles d'injection de 2 mAbs contre CD4-binding site (ou cocktail de mAbs)
 - Suppression de la virémie (-3.1 log)
 - Diminution de l'ADN proviral sang périphérique, muqueuse intestinale, ganglions
 - Pas d'émergence de résistance (2^{ème} injection efficace)
 - Amélioration de la réponse CD4+ et CD8+ anti-Gag: diminution des marqueurs d'épuisement et augmentation de la fonctionnalité (sécrétion IFN γ).
-
- a**
- PGT121, 3BNC117, b12
- Log RNA Copies/ml
- 0 7 14
- b**
- Lymph Node
- DNA Copies/10⁶ LNMC
- PGT121 DEN3
- Gastrointestinal
- DNA Copies/10⁶ GMNC
- PGT121
- c**
- CD8
- % PD1+ Ki67+ / IFN+ CD8+
- 0 11 28 98

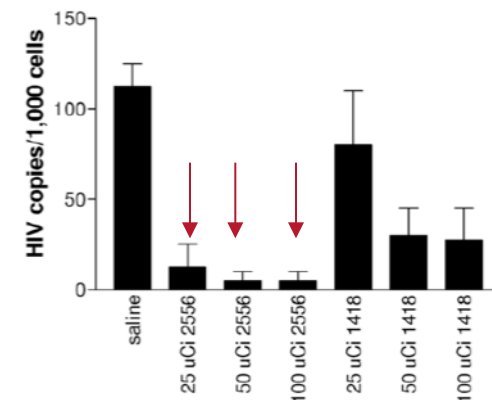
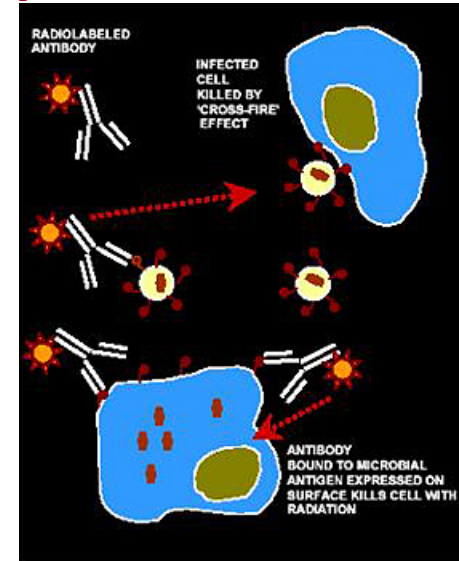


Capacité des mAbs à réduire la charge provirale dans les tissus → stratégies d'éradication?

- Ciblage du réservoir viral et clairance des cellules infectées (Fc et ADCC)
- Neutralisation directe des virions circulants -> diminution CV -> augmentation fonctionnalité RI
- Pb: Accessibilité limitée à certains sites anatomiques (SNC).

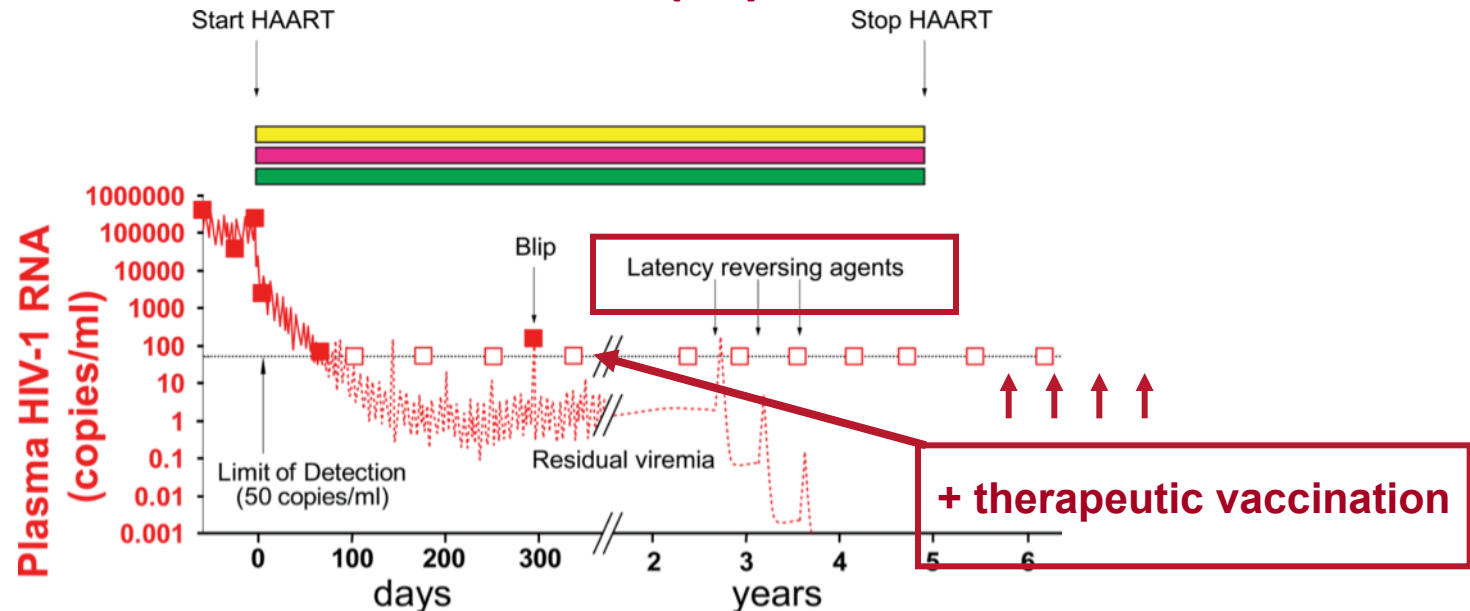
Radio-Immuno-Thérapie (RIT)

- Administration de mAbs conjugués à un isotope radioactif → doses cytotoxiques de radiation délivrées aux cellules exprimant l'Ag
 - Multiples combinaisons de radio-isotopes/Ac
 - Indépendance du statut immunologique du patient, des mécanismes de résistance (non neutralisants, pas de pression de sélection)
- Utilisation en cancérologie:
 - Bismuth-213 (^{213}Bi): ttt LMC, mélanome, gliome inopérable
 - Courte $\frac{1}{2}$ vie (46mn)
- Expérience en Maladie Infectieuses (infections fongiques, anthrax)
- VIH: Identification d'un mAb 2556 dirigé contre un épitope conservé de gp41 (entrée et fusion)
 - exprimé à la surface du virus, des cellules infectées
 - Non exprimé sur cellules non infectées → cible candidate pour RIT
- ^{213}Bi -2556
 - Souris SCID: élimination des PBMC infectés
 - In vitro: Sang de 15 patients HAART + RIT
 - Synergie RIT + ART: CV indétectable
 - Passage de la barrière hémato-méningée (PBMC et monocytes, atteinte des réservoirs SNC)
 - Essais cliniques de phase I...



SHOCK AND KILL : VACCINATION THERAPEUTIQUE (ALVAC, Ad5, DNA)

Elimination des cellules infectées, Augmenter et restaurer des réponses spécifiques anti-VIH efficaces polyfonctionnelles



BUT: Induction de CTL dirigés contre des épitopes conservés immunodominants, présentés par plusieurs allèles HLA différents

ALVAC, Ad5, DNaplasmide

Chez patients à CV indétectable

Peu d'efficacité

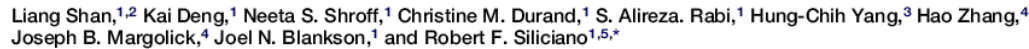
Pas d'éradication du réservoir latent, puisque ces cellules ne produisent pas de protéine virale

Expansion des clones existants, qui ont échoué au contrôle de l'infection

CD autologues pulsées par Ag VIH

→ **Stratégie en association avec une activation sélective du réservoir latent**

→ **Nouvelles stratégies vaccinales:** vecteurs CMV, vaccin peptidique amphiphiles ciblé pour les ganglions, Ad26 (induction RI innée pour phénotypes T plus fonctionnel)



Elimination du réservoir latent après réactivation virale

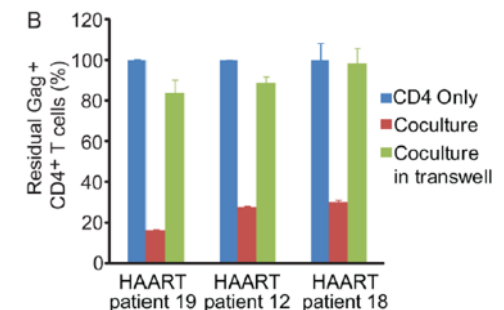
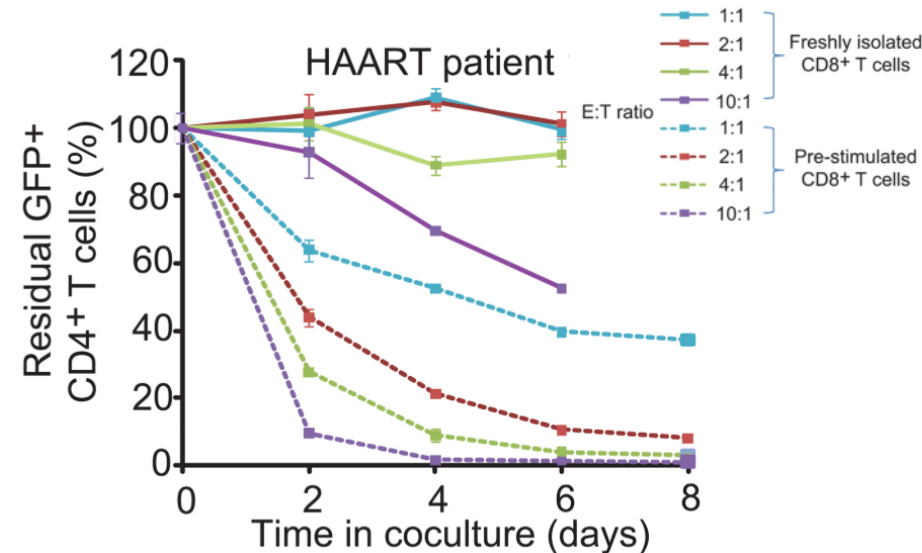
Stimulation of HIV-1-Specific Cytolytic T Lymphocytes Facilitates Elimination of Latent Viral Reservoir after Virus Reactivation



Stimulation VIH-Spécifique des CTL du patient
AVANT réactivation virale

→ Destruction rapide et efficace des CD4+ infectées latentes.

Les virus autologues produits à partir du réservoir latent n'échappent pas aux CTL du patient.



Reduction of GFP+ cells is cell contact-dependent and MHC class-I restricted

STRATEGIES D'ERADICATION

SHOCK and KILL

Anticorps spécifiques

- Ac Neutralisants
- Radio-immunothérapie

Vaccination thérapeutique

Immuno-modulation

- **Booster la Réponse Immunitaire:**
 - **Lever l'inhibition immune: blocage des « immune Checkpoints »**
 - Activation immune globale: agonistes des TLR

Blocage des molécules inhibitrices (« Immune Checkpoint ») de la réponse immunitaire T: exemple de PD-1

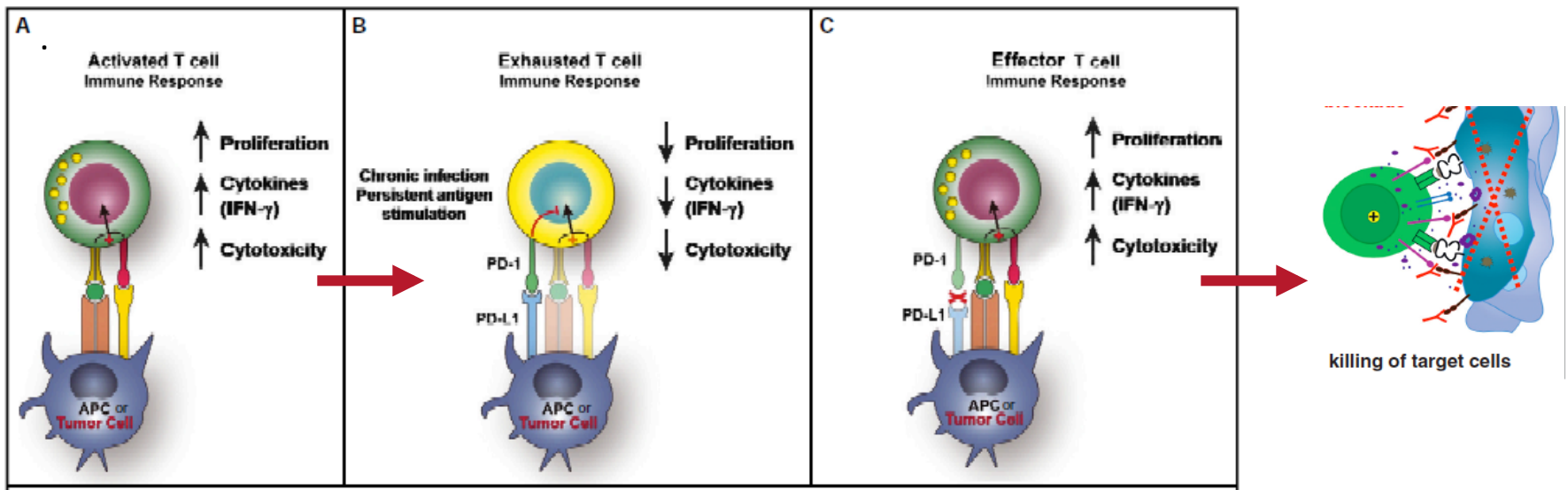
Mécanisme Régulateurs/Protecteur: Infections chroniques -> activation chronique: épuisement des LT spécifiques de l'Ag (exhaustion) par défaut de signaux de co-stimulation et expression de signaux inhibiteurs: PD-1, CTLA-4...

→ Suppression des fonctions effectrices des LT et retour à un état non activé (limitations des dommages inflammatoires).

PD-1, un marqueur d'exhaustion fonctionnelle, est le mieux caractérisé des « immune checkpoints ».

- Membre de la famille CD28/CTL-A4, ligands de PD-1 (PDL-1/2) exprimés +++ dans les tissus

→ **Inhibiteurs de PD-1 pour rétablir la fonctionnalité effectrice des LT (« kill » / éradication) [K]**



CD80, CD86
 CD28
 MHC
 Peptide Antigen
 TCR
 PD-L1
 PD-1
 Blocking Antibody

Chomont et al. Nat Med 2010;
Fromentin, 30 years of AIDS, 2013;

Fromentin et al. CROI 2014

A.O. Kamphorst, R Ahmed, Curr Op Immunol 2013

Intlekofer JLB 2013

Blockade of either PD-1 or PD-L1 in treatment of cancers

The NEW ENGLAND JOURNAL of MEDICINE

Safety, Activity, and Immune Correlates of Anti-PD-1 Antibody in Cancer

Suzanne L. Topalian, M.D., F. Stephen Hodi, M.D., Julie R. Brahmer, M.D., et al

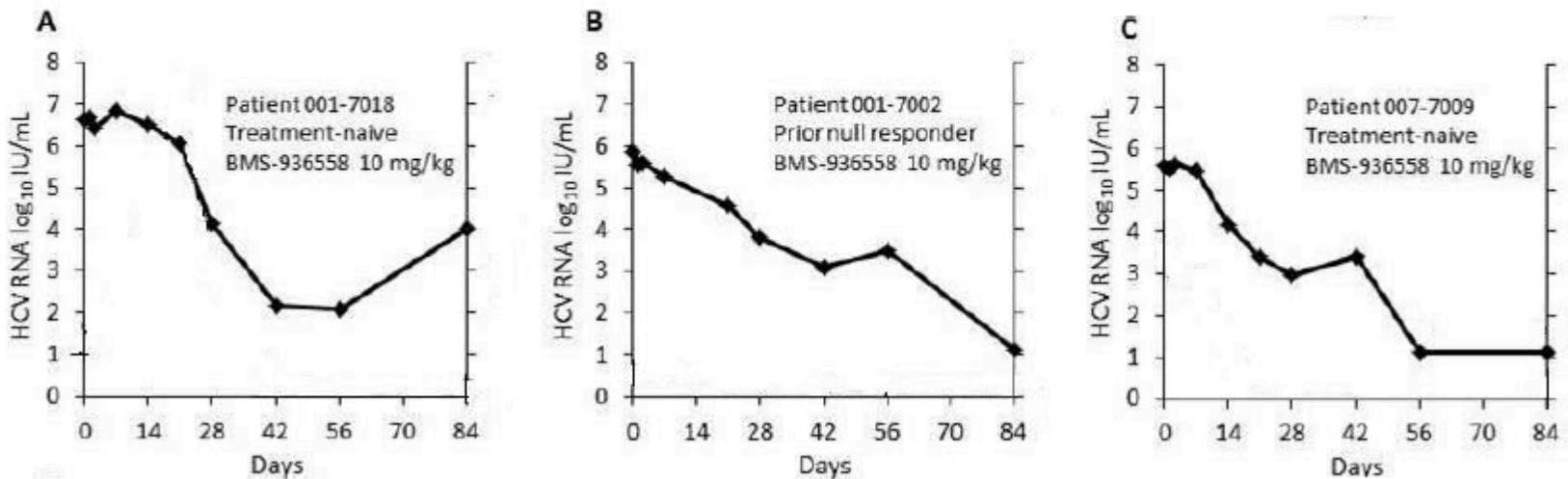
The NEW ENGLAND JOURNAL of MEDICINE

Safety and Activity of Anti-PD-L1 Antibody in Patients with Advanced Cancer

Julie R. Brahmer, M.D., Scott S. Tykodi, M.D., Ph.D., Laura Q.M. Chow, M.D., et al

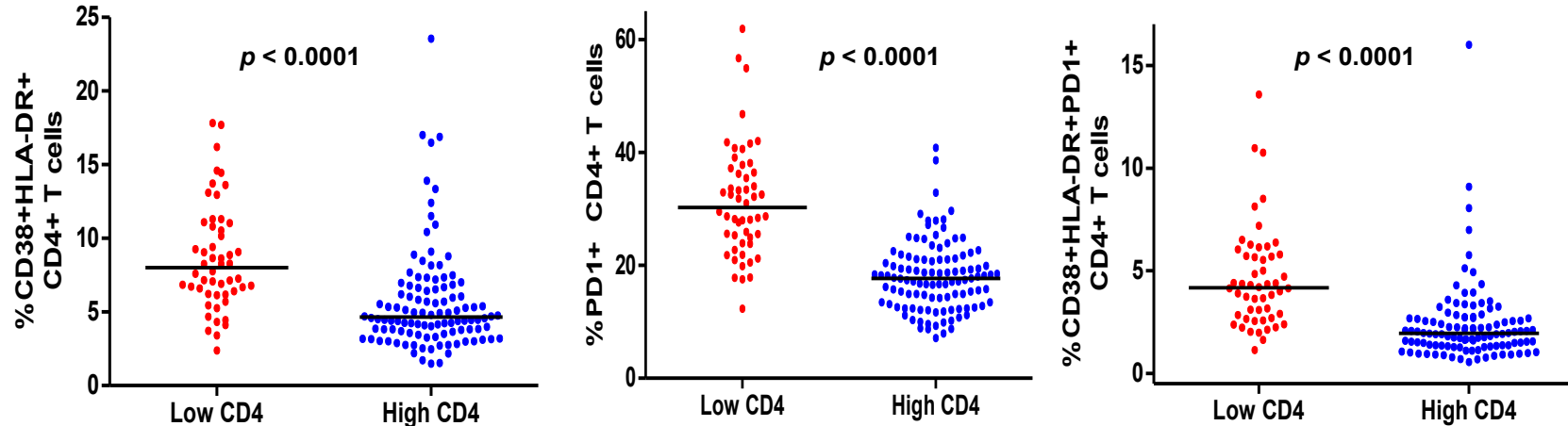
Proof of Concept for Anti-PD-1 (BMS-936558) in Chronic HCV

Gardiner et al PLoS One 2013

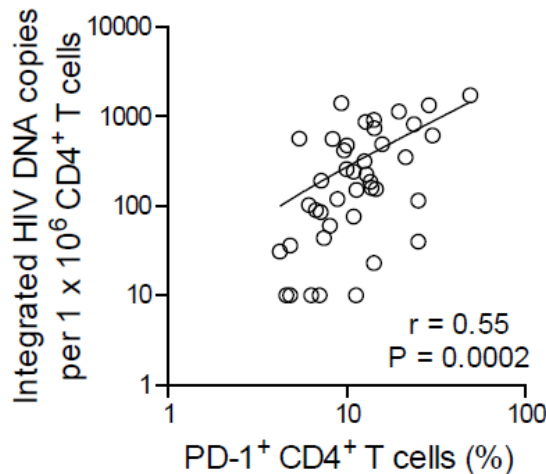


Immune Checkpoint PD-1 chez le patient VIH

CD4+ T Cell Activation and PD-1 Expression are Higher in Low CD4+ Group



Highly Significant Association between Proviral DNA and Frequency of PD-1 Expressing CD4+ T



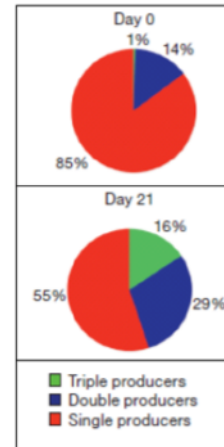
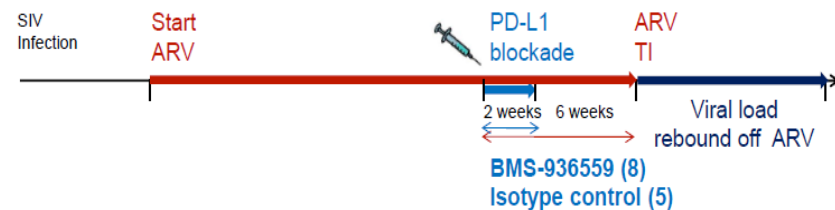
- Puisque les LT activés ont plus de risque d'être infectés que les cellules latentes, les LT exprimant PD-1 (signe d'une activation préalable) devraient être enrichies en VIH.
 - La taille du réservoir est corrélé à la fréquence des LT CD4+ qui expriment PD-1 (+ Tim-3, TIGIT)
 - Les LT CD4+ mémoire exprimant PD-1 sont enrichis en VIH.
 - **Inhibiteurs de PD-1 pour diminuer l'établissement et la maintenance du réservoir**

PD-1 = marqueur des LT CD4+ infectés latentes?

Blocage des molécules inhibitrices (« Immune Checkpoint ») de la réponse immunitaire T: PD-1

Blocage PD-L1/PD-1 *in vivo* chez le SIV

Study design:



- restore les RI cellulaire et humorale spécifiques,
- améliore le contrôle de la réplication virale après IT
- réduit l'activation immune
- Prolonge la survie

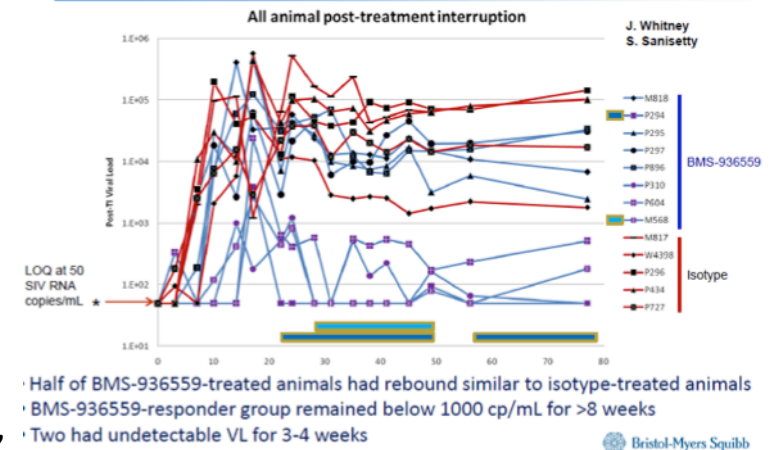
→ 2 Essais ACTG en cours chez le patient VIH:

- mAb anti-PD1 (MK-3475, Merck) : phase I, ACTG 5301
- mAb anti-PD-L1 (BMS-936559): phase I, ACTG 5326 (1Q2014))

Objectifs:

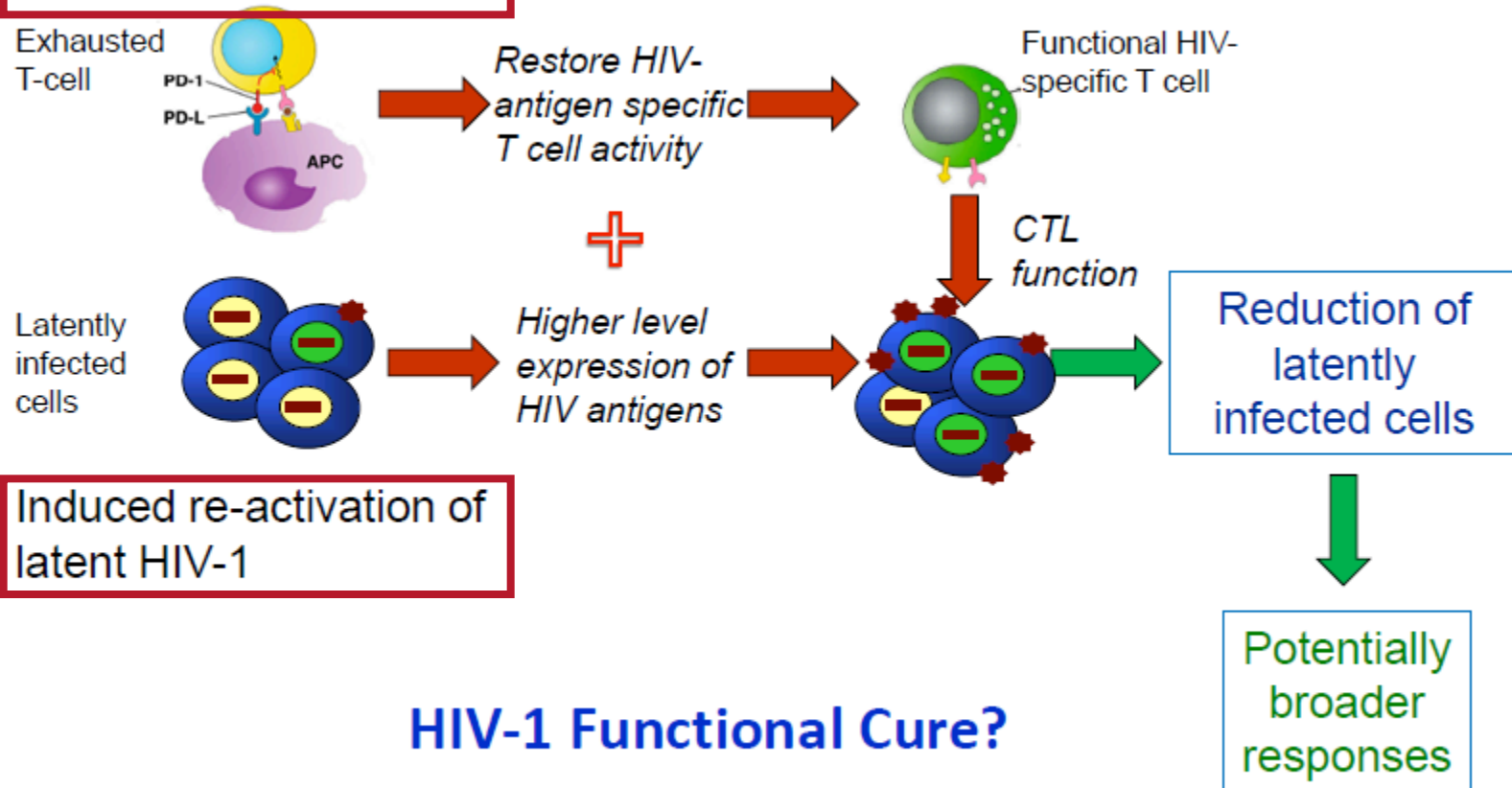
- Immuno-viro: restaurer la fonction des LT + purge du réservoir latent.
- Safety: auto-immunité

Kinetics of viral load rebound post-treatment interruption



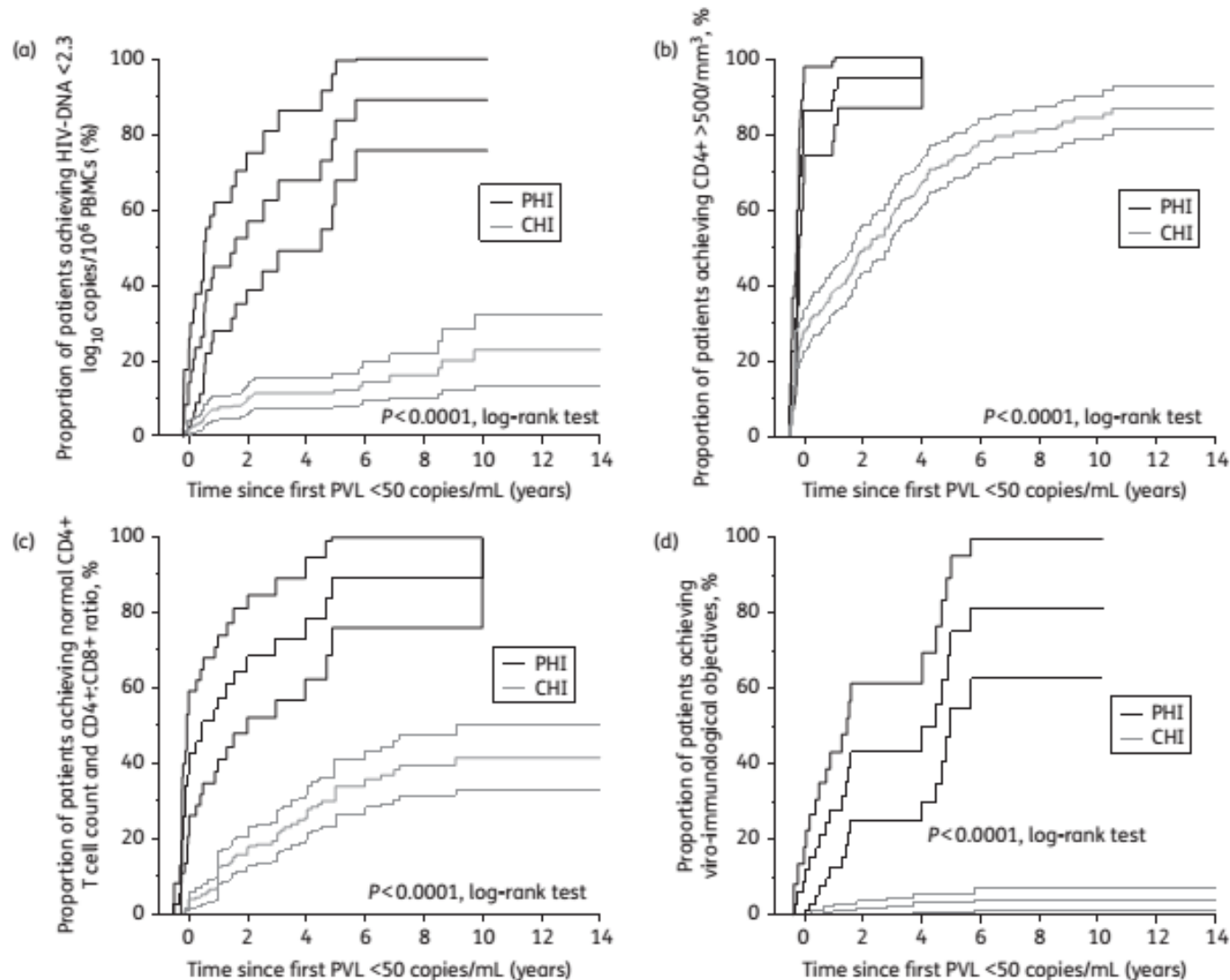
Blocage des molécules inhibitrices (« Immune Checkpoint ») de la réponse immunitaire T: exemple de PD-1

Treatment with α PD-L1



**A défaut d'éliminer le réservoir, peut-on
le limiter ?**

Impact du traitement dès la primo-infection sur le réservoir viral et la normalisation des CD4



Impact du traitement dès la primo-infection sur le réservoir viral et la normalisation des CD4

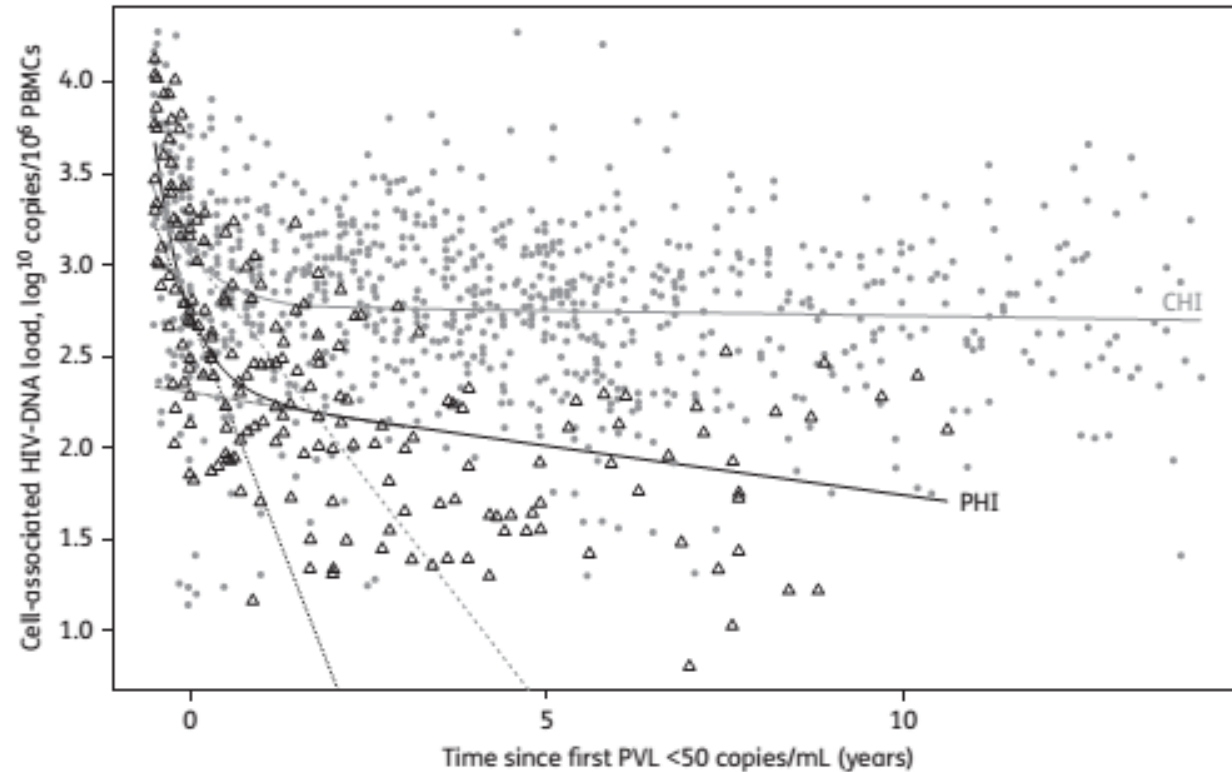
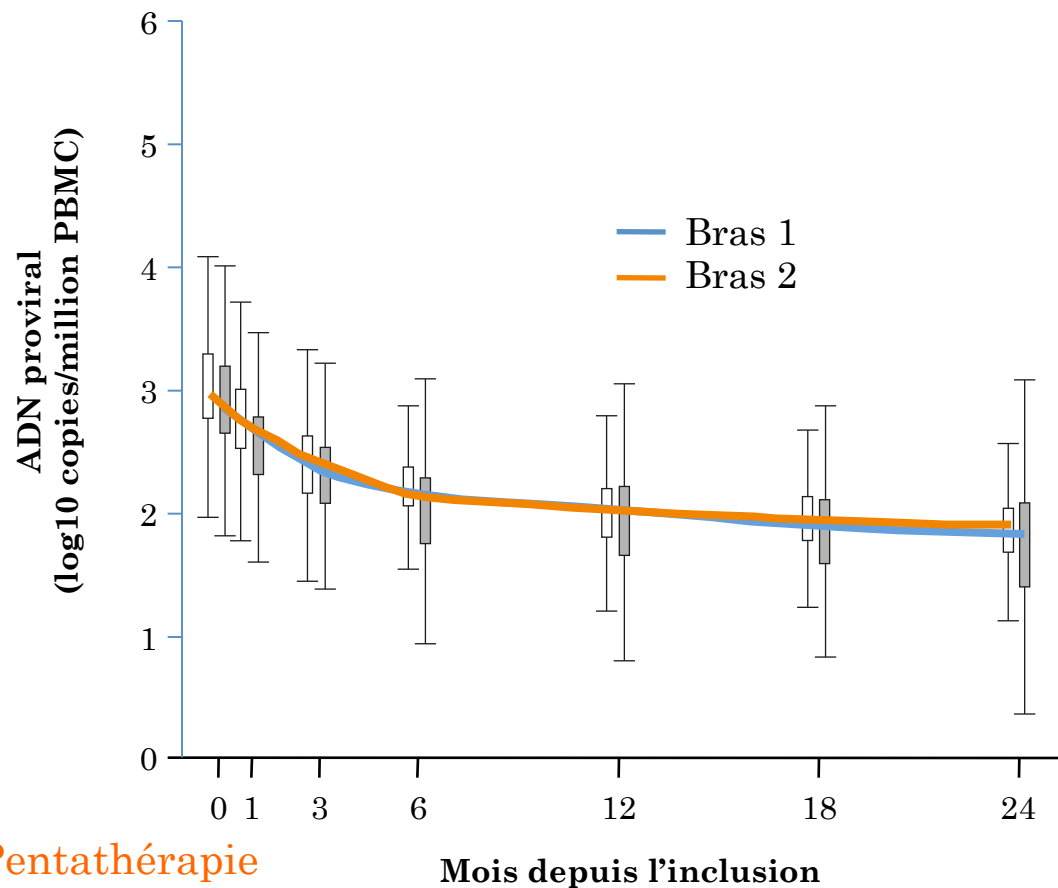


Figure 1. Bi-exponential model of HIV DNA decay stratified by the timing of treatment initiation. The grey dots represent patients who started treatment during CHI and the triangles represent patients who started treatment during PHI. The grey curve models HIV DNA decay in the CHI group and the black curve models HIV DNA decay in the PHI group. The dotted and dashed lines represent the slopes of decay during the two periods distinguished by the mixed-effects bi-exponential model for the PHI and CHI groups, respectively.

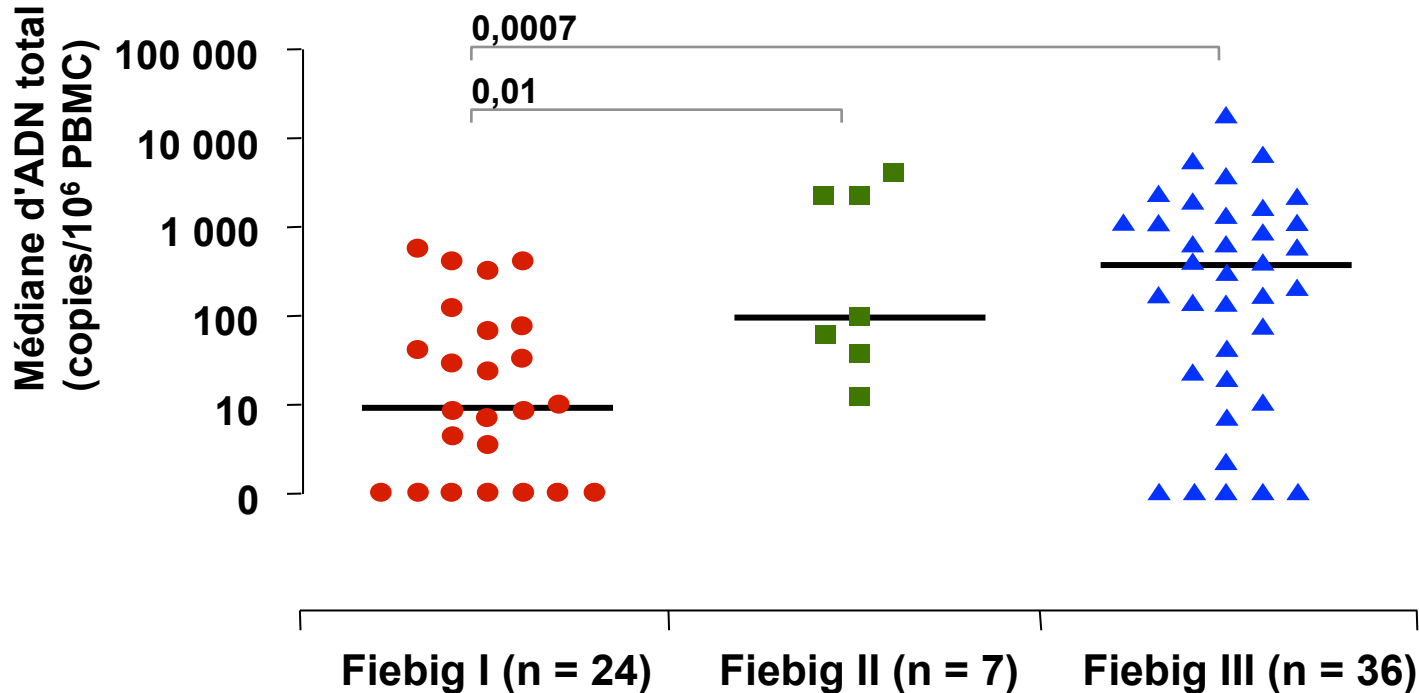
ÉTUDE OPTIPRIM-ANRS-147 : IMPACT D'UN TRAITEMENT PRÉCOCE SUR LE RÉSERVOIR VIRAL

Bénéfice important sur les réservoirs viraux sans bénéfice additionnel de la pentathérapie (x 2/j) par rapport à la trithérapie classique (x 1/j)



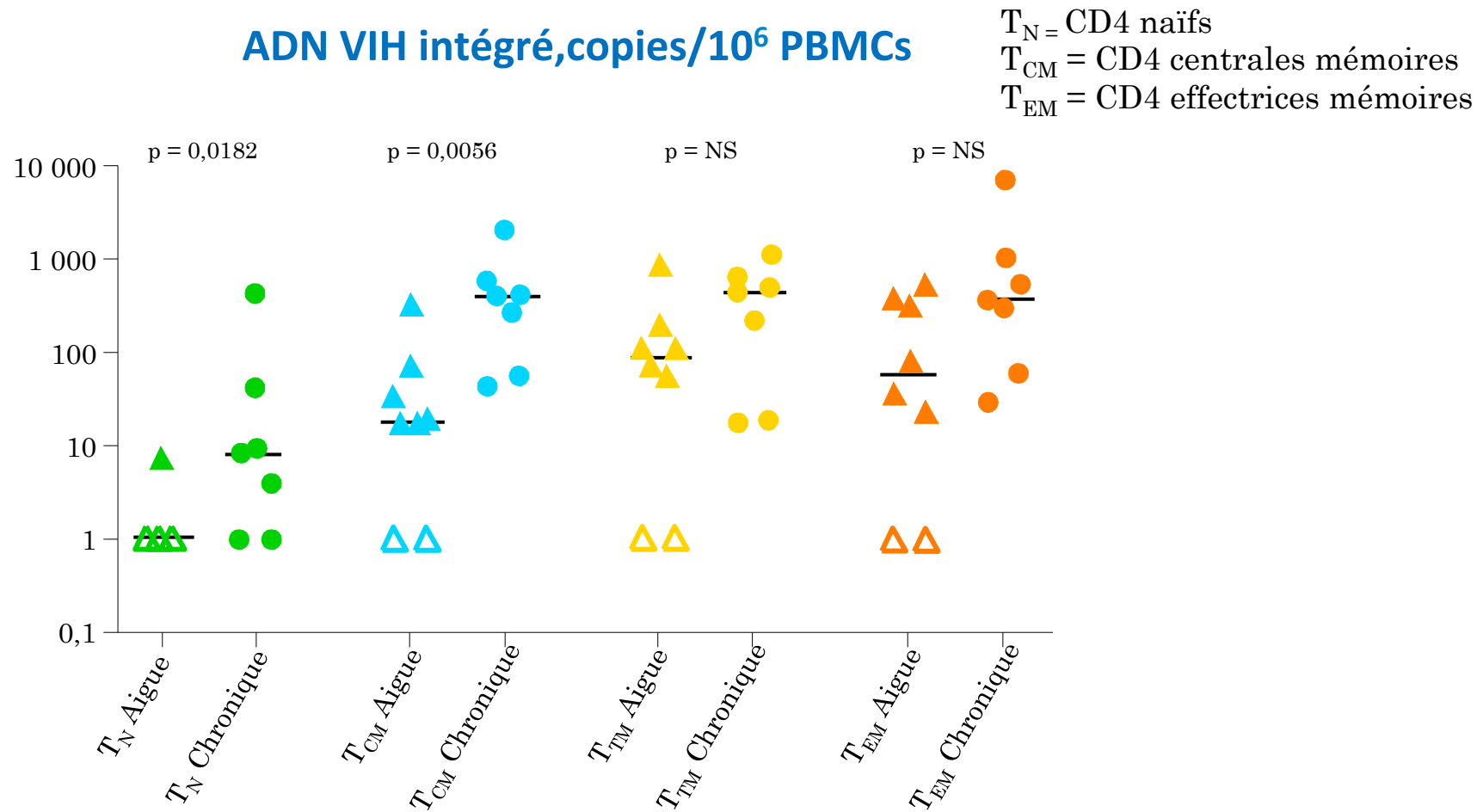
Bras 1 : **Pentathérapie**
Bras 2 : **Trithérapie**

BÉNÉFICE DU TRAITEMENT TRÈS PRÉCOCE SUR LE RÉSERVOIR VIRAL



L'ADN total dans les PBMC est significativement plus faible chez les patients au stade I par rapport aux patients au stade II et III plus faible. L'ADN intégré dans les PBMC n'est pas détecté chez 92 % des patients au stade I, 29 % au stade II et 53 % au stade III

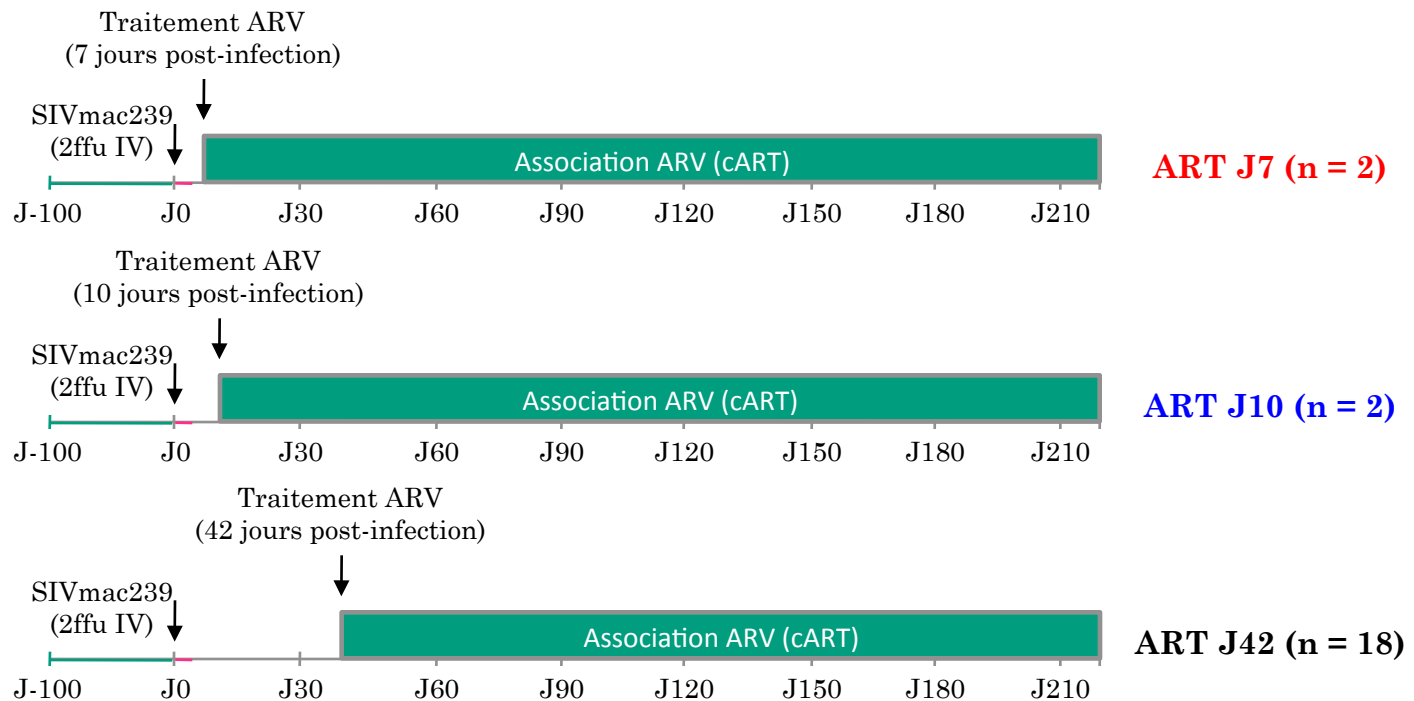
IMPACT DU TRAITEMENT PRÉCOCE SUR LES SOUS-POPULATIONS DE CD4



- Un traitement ARV précoce prévient l'établissement du réservoir latent dans les cellules T_{CM} à longue durée de vie

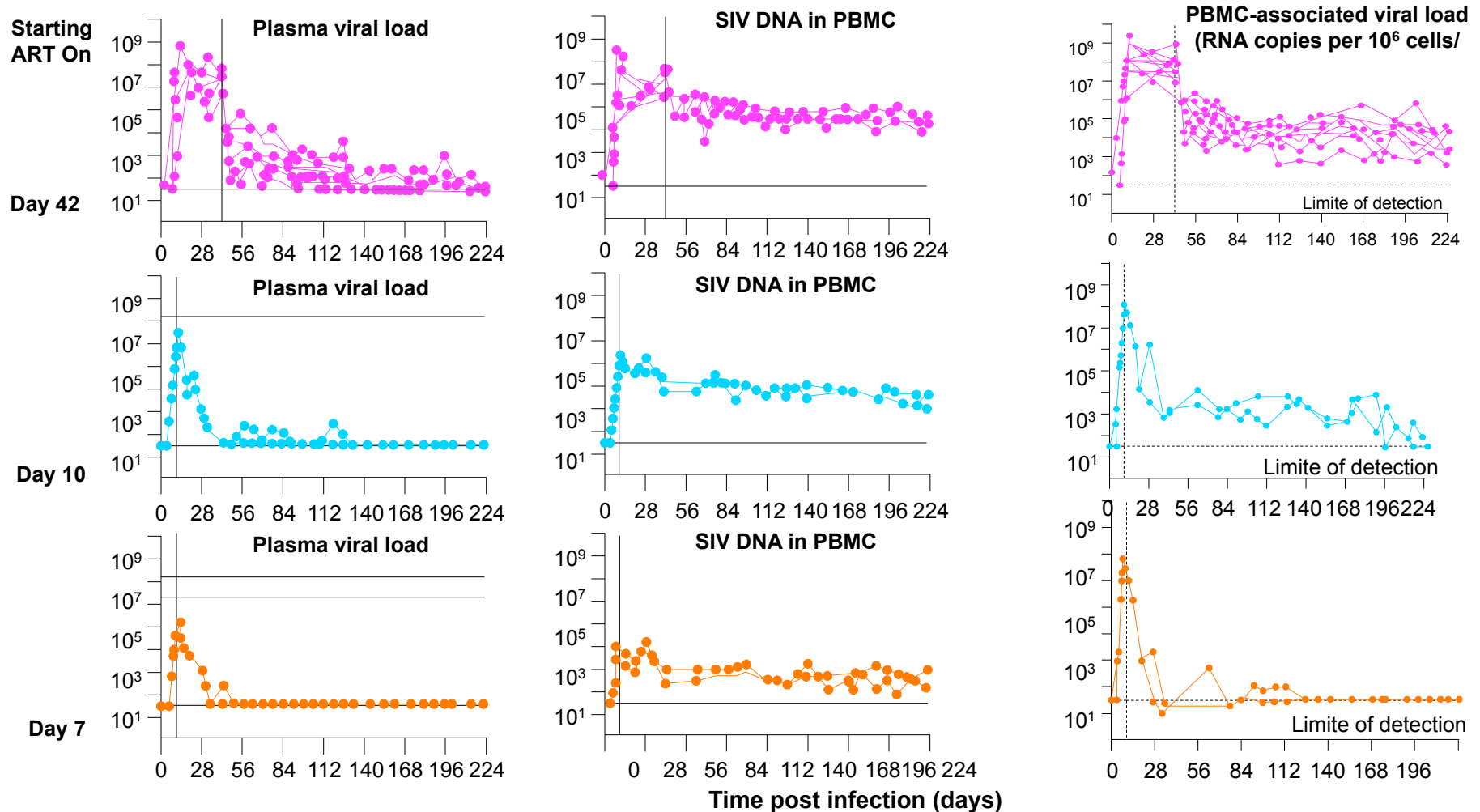
BÉNÉFICE D'UN TRAITEMENT PRÉCOCE (PRIMO-INFECTION) DANS LE MODÈLE SIV

- Objectif : déterminer dans le modèle de l'infection SIV, chez le macaque, le bénéfice d'un traitement (TDF/FTC/DTG/DRV/r) initié avant (J7) ou pendant (J10) le pic de réplication virale ou à la phase chronique (J42) après l'infection



BÉNÉFICE D'UN TRAITEMENT PRÉCOCE (PRIMO-INFECTION) DANS LE MODÈLE SIV

Un Tt très précoce diminue le niveau de l'ADN et de l'ARN du SIV dans les PBM

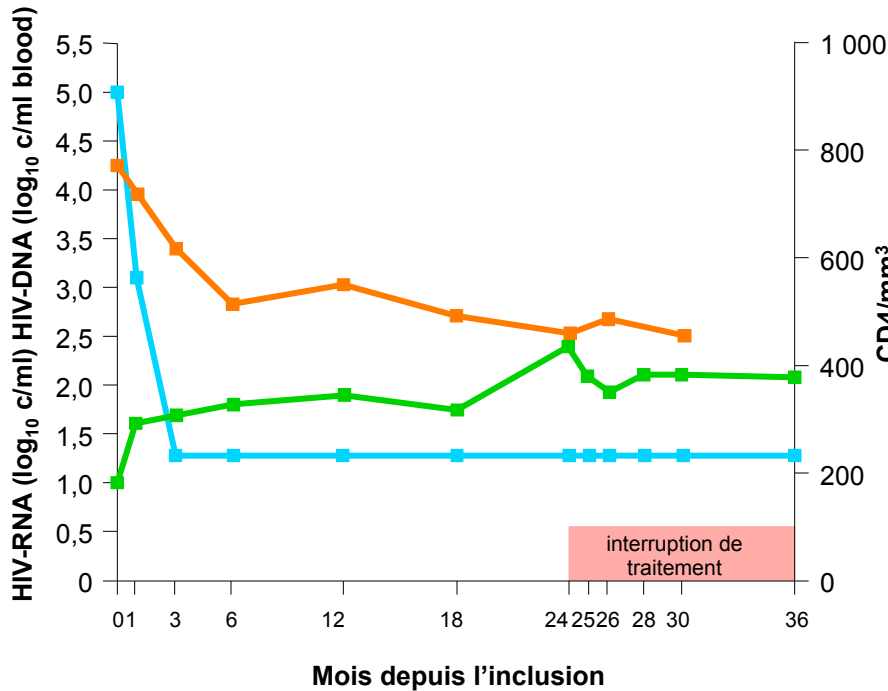


➔ Intérêt de l'initiation la plus précoce possible - lors de la primo-infection - pour limiter autant que possible la dissémination virale dans le réservoir sanguin périphérique et dans les compartiments lymphoïdes tissulaires

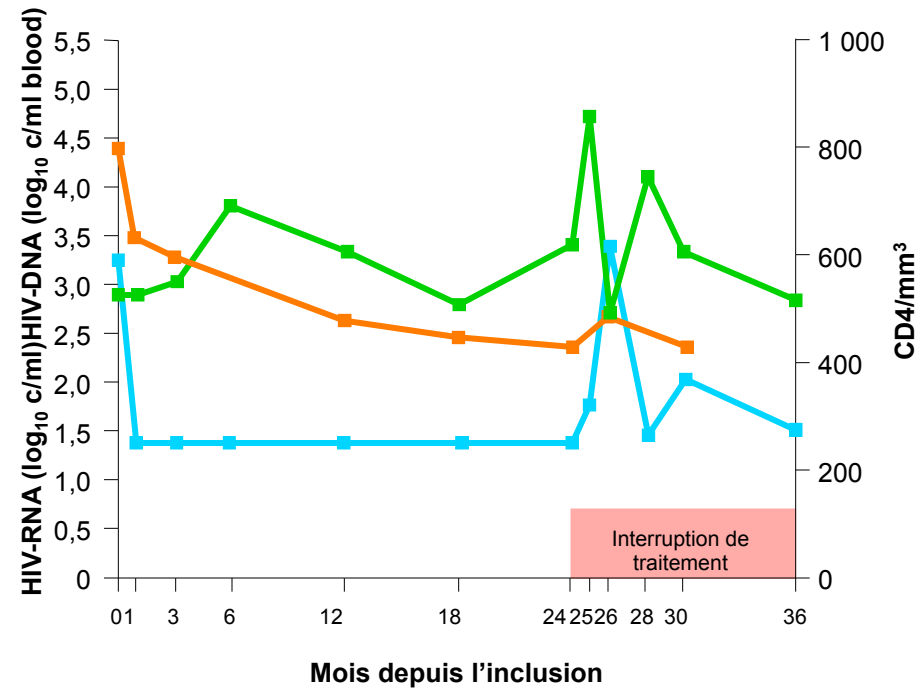
ETUDE OPTIPRIM-ANRS-147

- 2 « contrôleurs post traitement » (PTC)

Patient 1



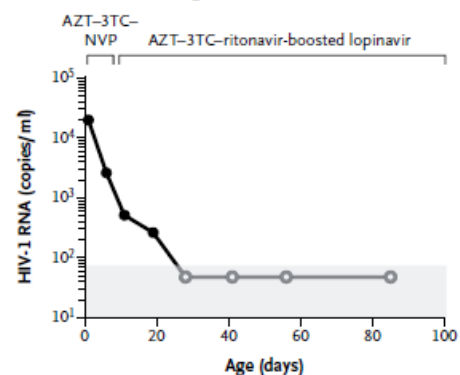
Patient 2



— ARN VIH (log10 copies/ml) — ADN VIH (log10 copies/ml) — CD4/mm³

CURE FONCTIONNELLE « The Mississippi Child »

A Confirmation of HIV-1 Infection



B Sustained Control of HIV-1 Replication

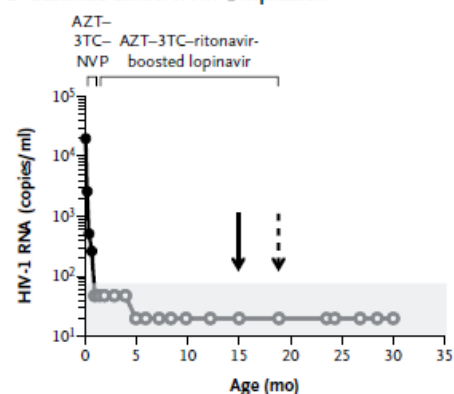
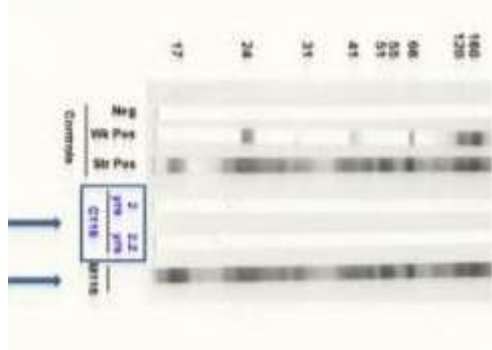


Table 2. Specialized Studies to Assess Persistence of HIV-1 Infection in the Child.*

Sample Type	Quantity	Cells Tested	
		<i>no. of cells or plasma volume</i>	<i>no. of positive replicates/ no. of wells</i>
Total proviral DNA			
PBMCs			
At 24 mo	<2.7 copies/10 ⁶ cells	122,000	0/2
At 26 mo	4.2 copies/10 ⁶ cells†	113,000	1/6
Resting CD4+ T cells			
At 24 mo	<3.5 copies/10 ⁶ cells	96,500	0/3
At 26 mo	<2.5 copies/10 ⁶ cells	134,000	0/6
PBMCs enriched for activated CD4+ T cells			
At 24 mo	<2.2 copies/10 ⁶ cells	154,000	0/6
At 26 mo	<2.6 copies/10 ⁶ cells	130,000	0/6
Monocyte-derived adherent cells			
At 24 mo	37.6 copies/10 ⁶ cells‡	14,300	1/3
At 26 mo	<11.5 copies/10 ⁶ cells	29,000	0/6
Residual viremia in plasma			
At 24 mo	1 copy/ml	4 ml	3/3
At 26 mo	<2 copies/ml	4 ml	0/4
Infectious virus recovery at 24 mo	<0.05 IUPM§	22 ×10 ⁶ resting CD4+ T cells	0/22



Conclusion

- Pas d'exemple d'élimination d'infection virale chronique, avec intégration du génome viral
- Diminution du réservoir
 - Echec des stratégies d'intensification, d'immunomodulation...
 - Diminution du réservoir déjà établi par thérapie génique, allogreffe ...mais non applicable à large échelle
 - Limitation possible de la formation du réservoir par un traitement antirétroviral précoce
- Dans la stratégie de Shock and Kill: Le système immunitaire doit voir les cellules infectées
 - Nécessité de coupler les stratégies anti-latence avec de l'immunothérapie pour restaurer la fonctionnalité des cellules du système immunitaire
 - Effet de réactivation modeste
 - Effet paradoxal
 - Problème de toxicité

→ Du rêve de l'éradication à l'espoir du contrôle naturel de l'infection.....