



Réplication résiduelle

Pr Vincent CALVEZ

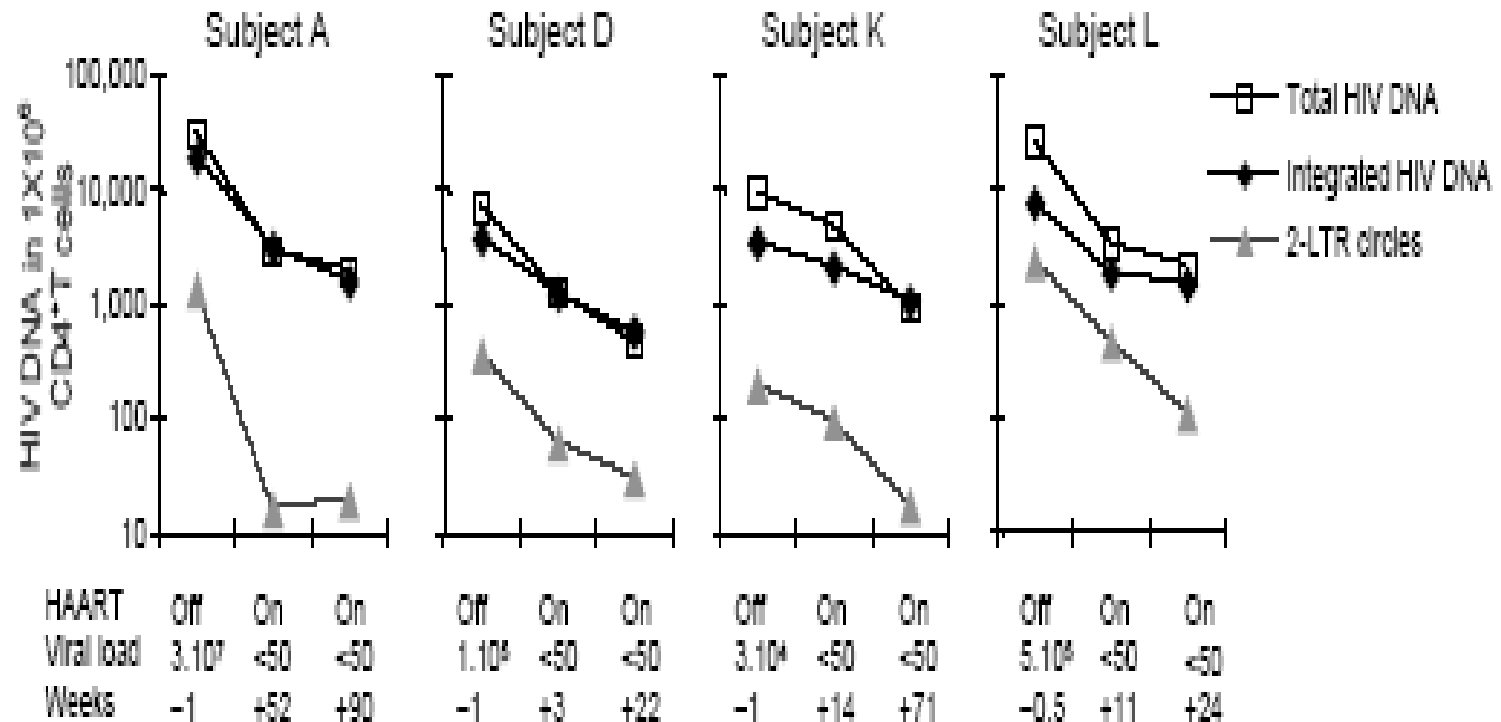
CHU Pitié-Salpêtrière

INSERM U 943

ANRS AC11 Resistance

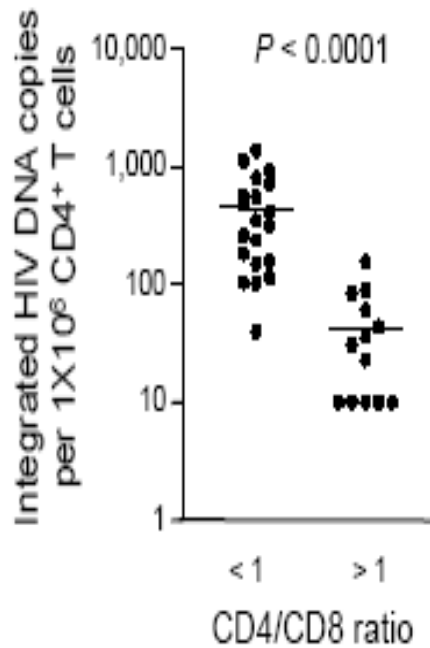
ART bloque la réplication virale avec persistance de ADN viral intégré

a

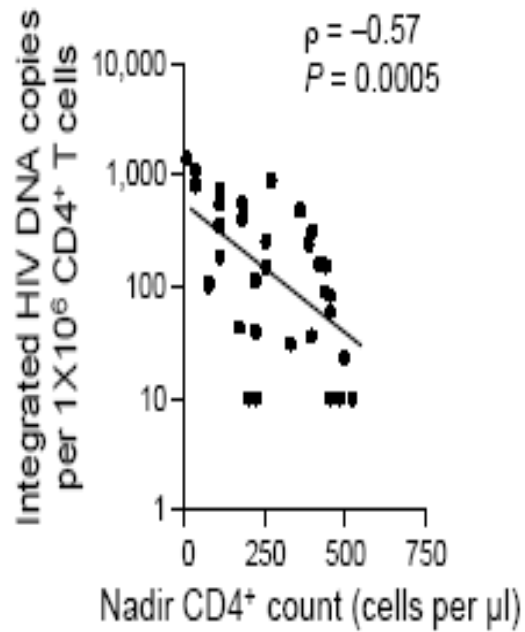


Taille du réservoir est établie avant les ART

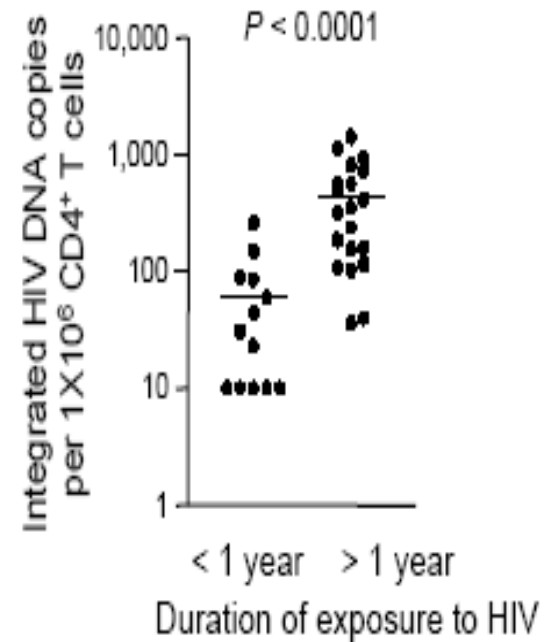
a



b

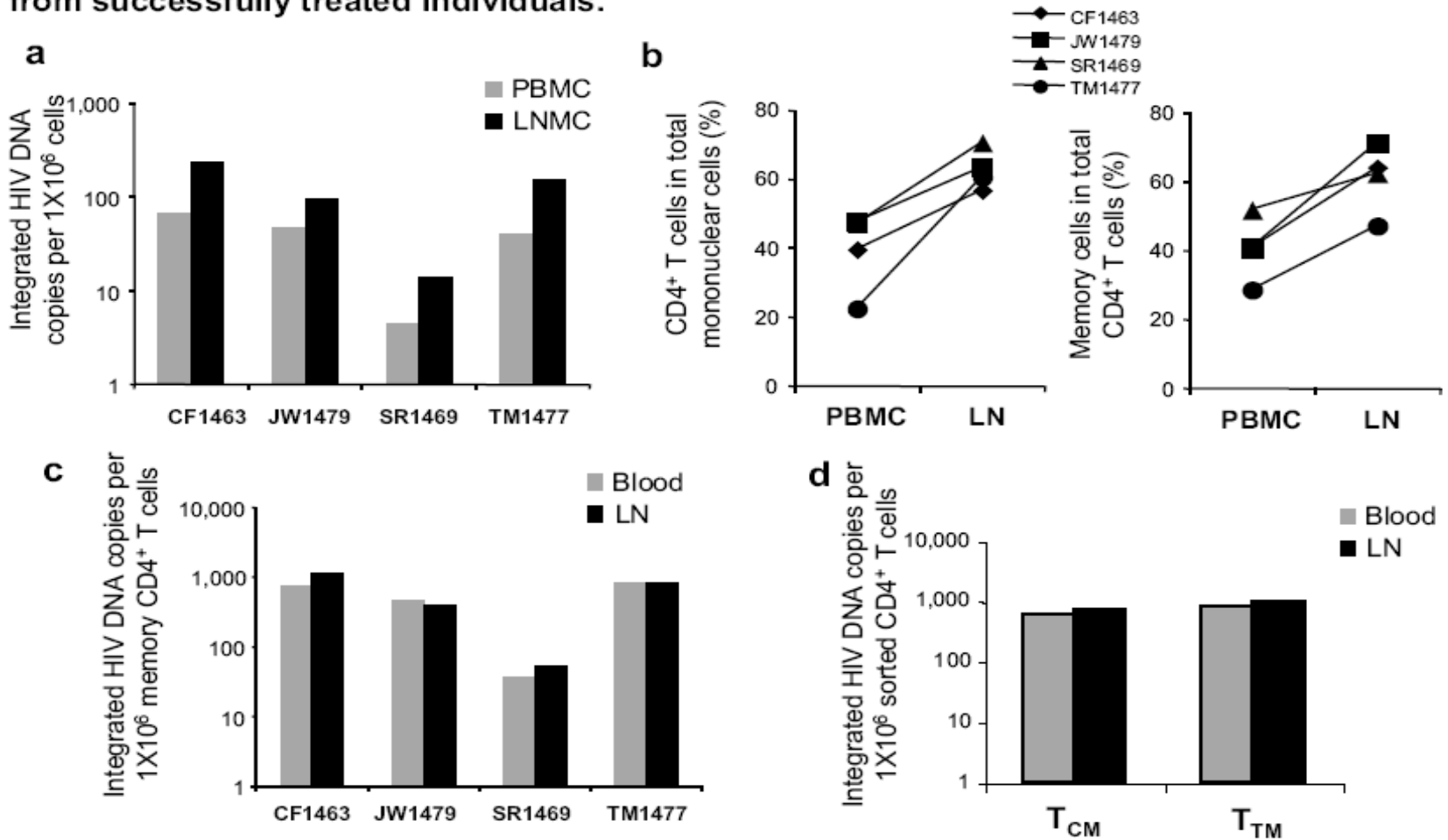


c

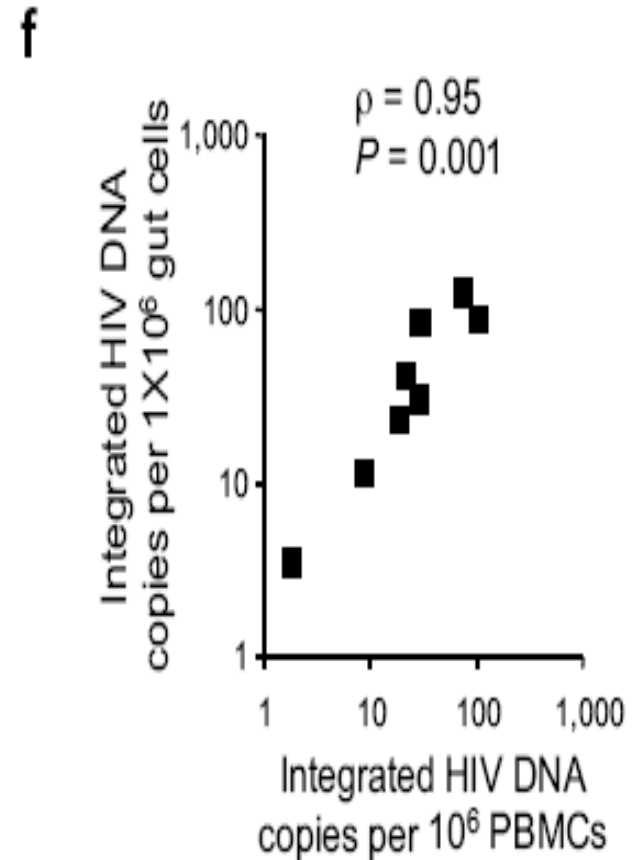
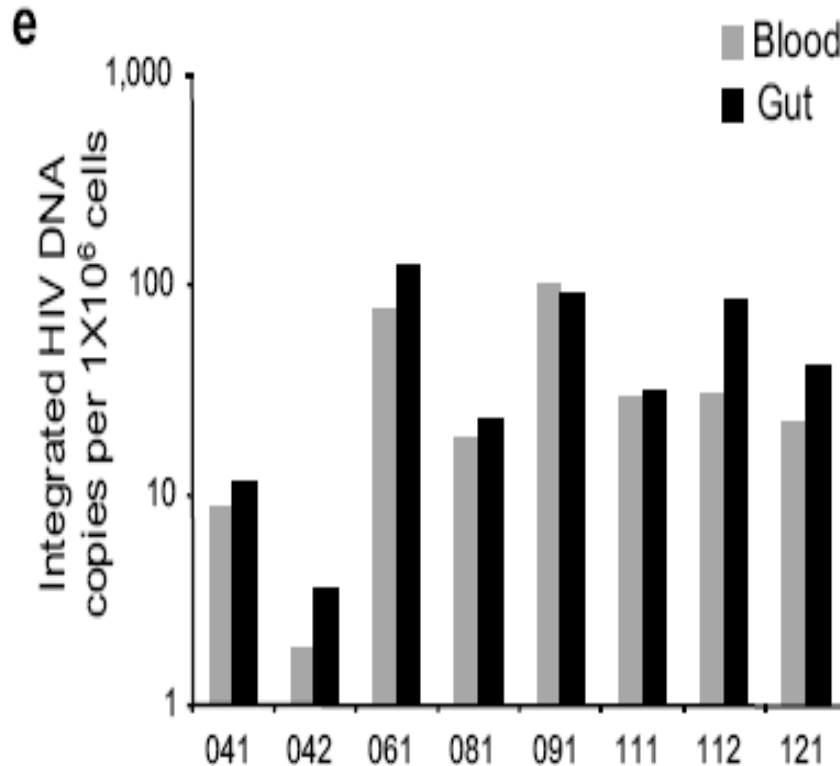


Réservoir dans le sang et ganglions

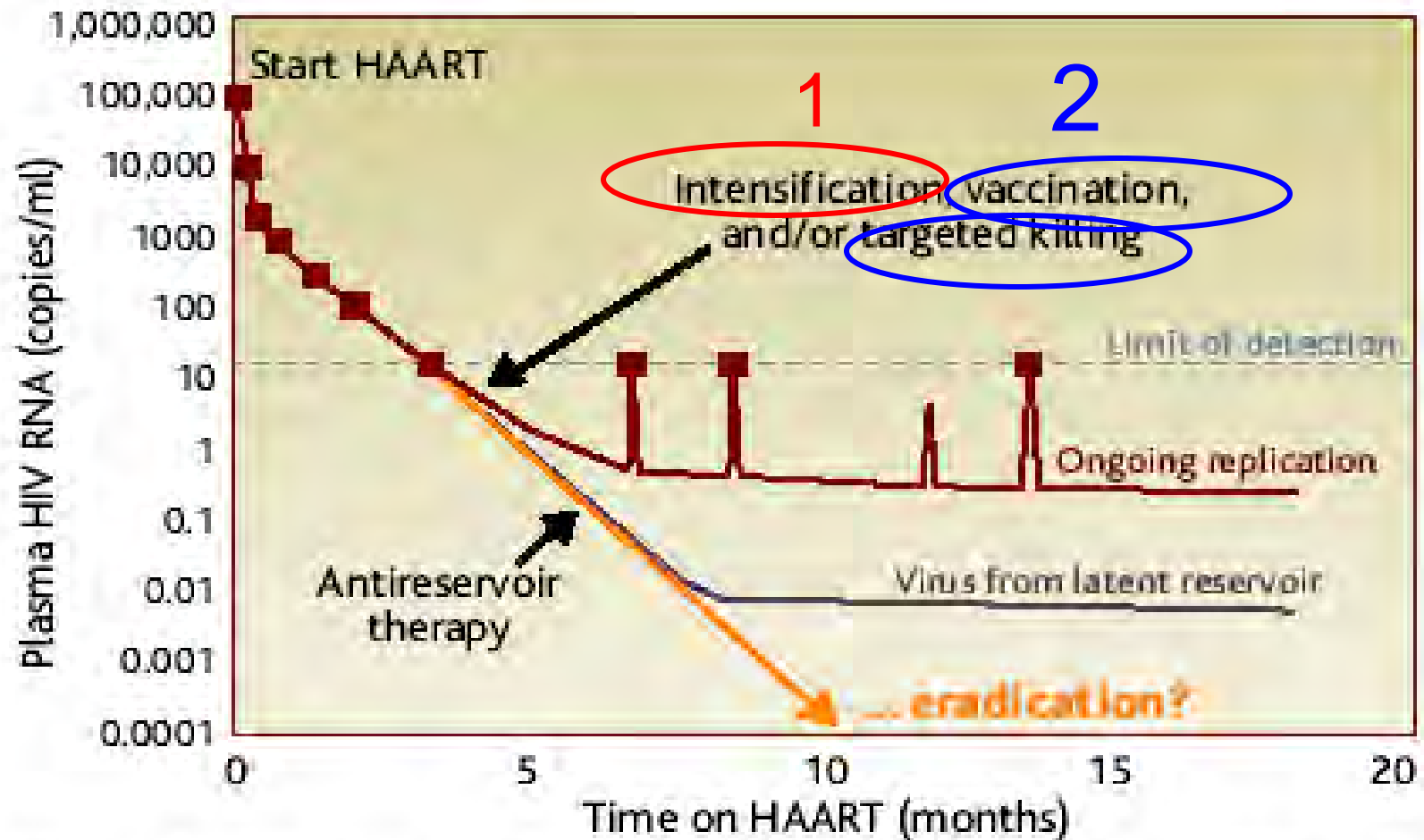
Supplementary Figure 3. Similar infection frequencies in lymphoid tissues and blood from successfully treated individuals.



Réservoir dans le sang et muqueuse digestive +++

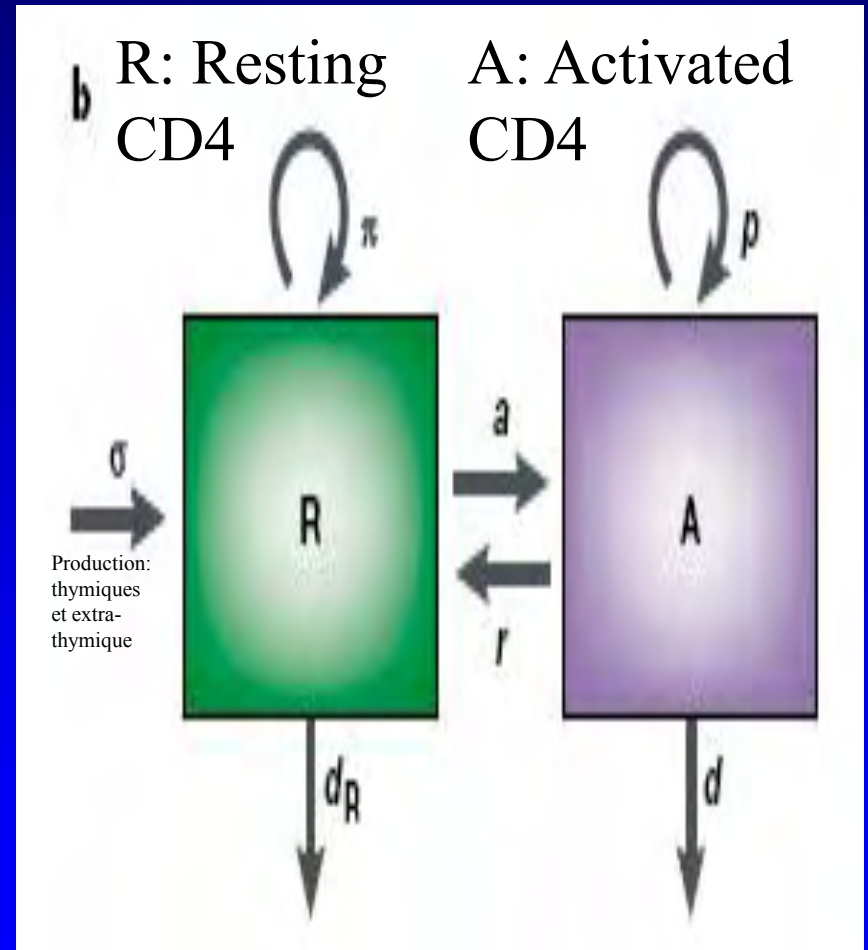
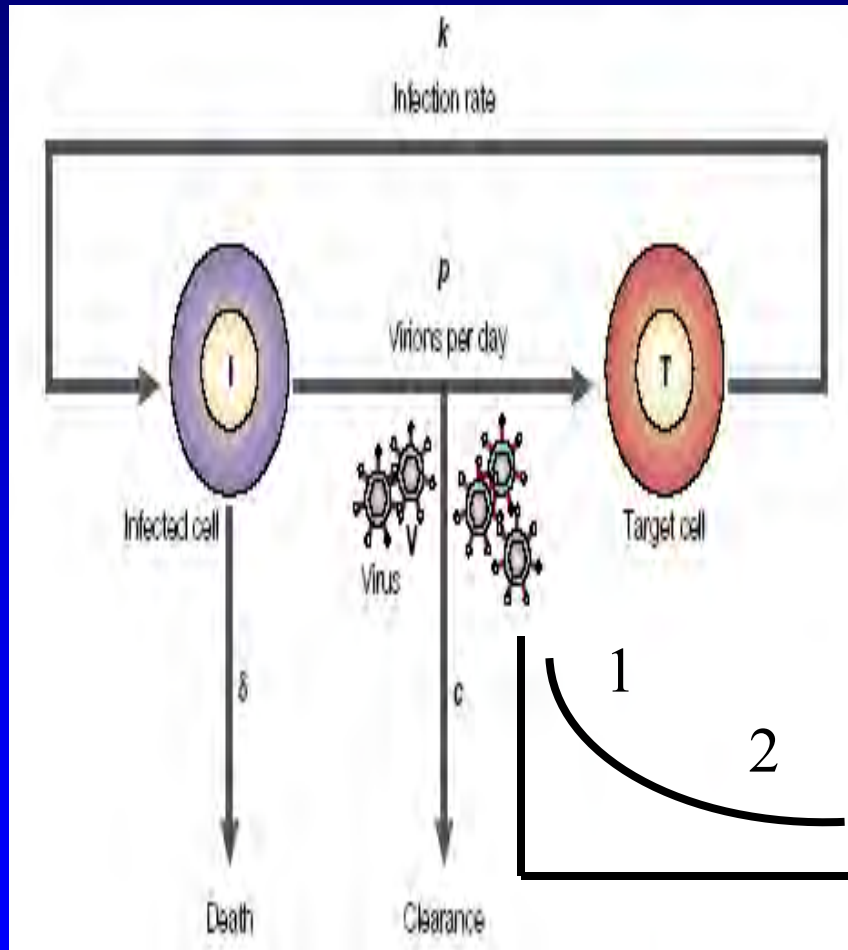


Modèles théoriques

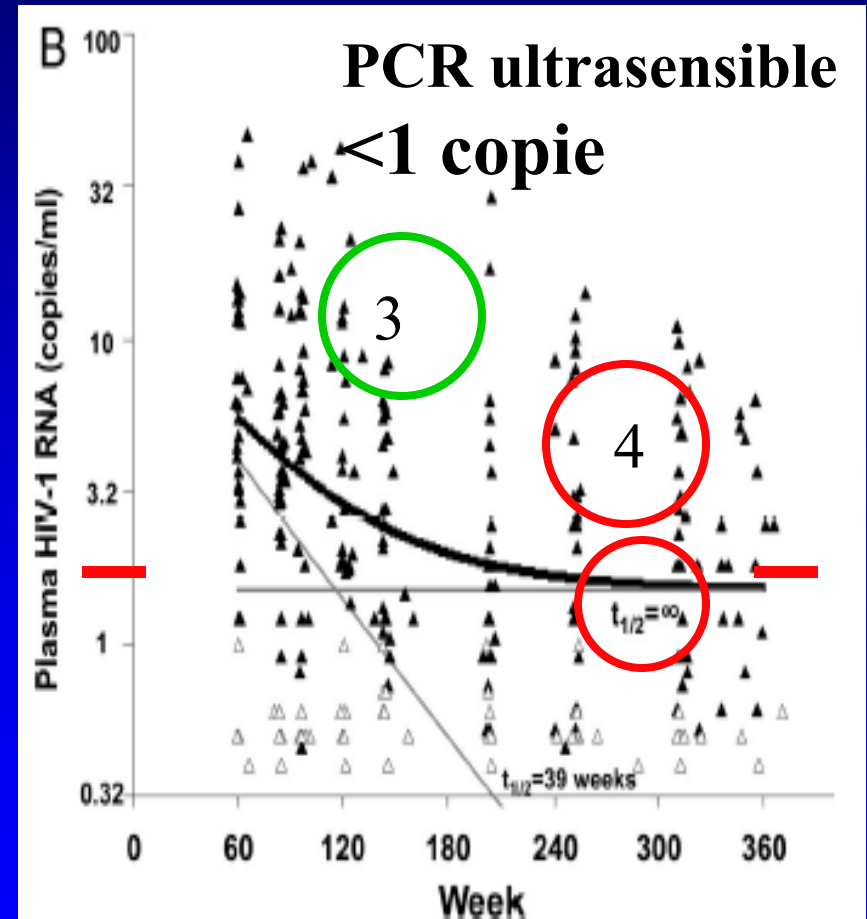
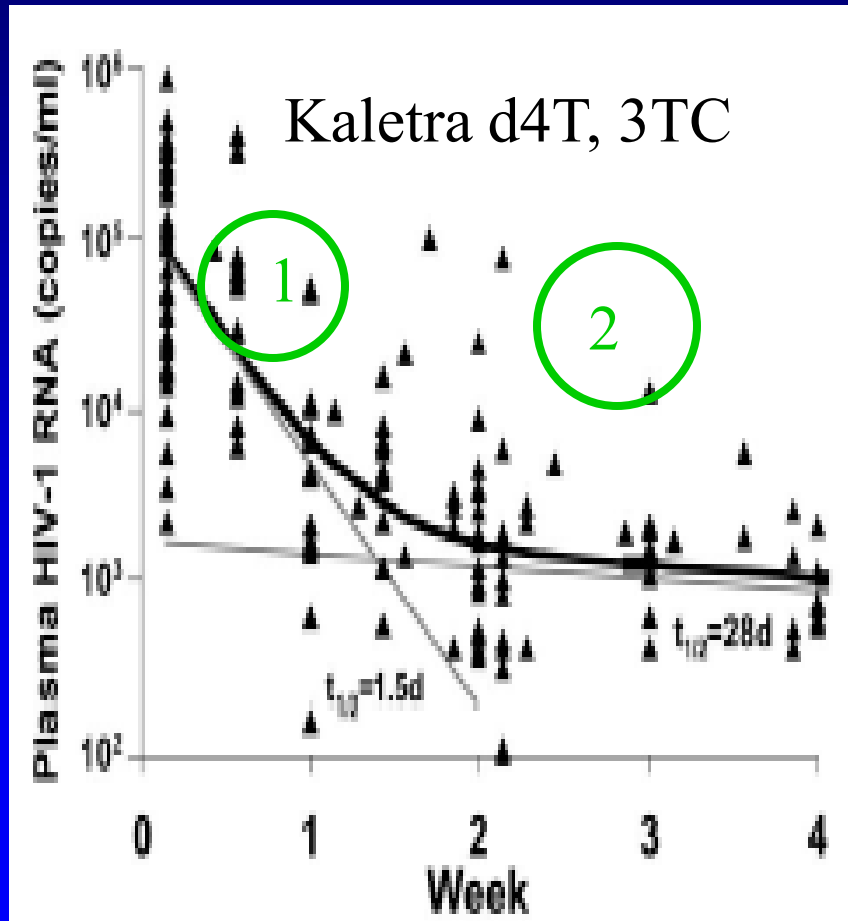


Aiming low. Antiretroviral therapy knocks HIV below detectable levels (upper line); new therapy aims also to eradicate it from latent reservoirs.

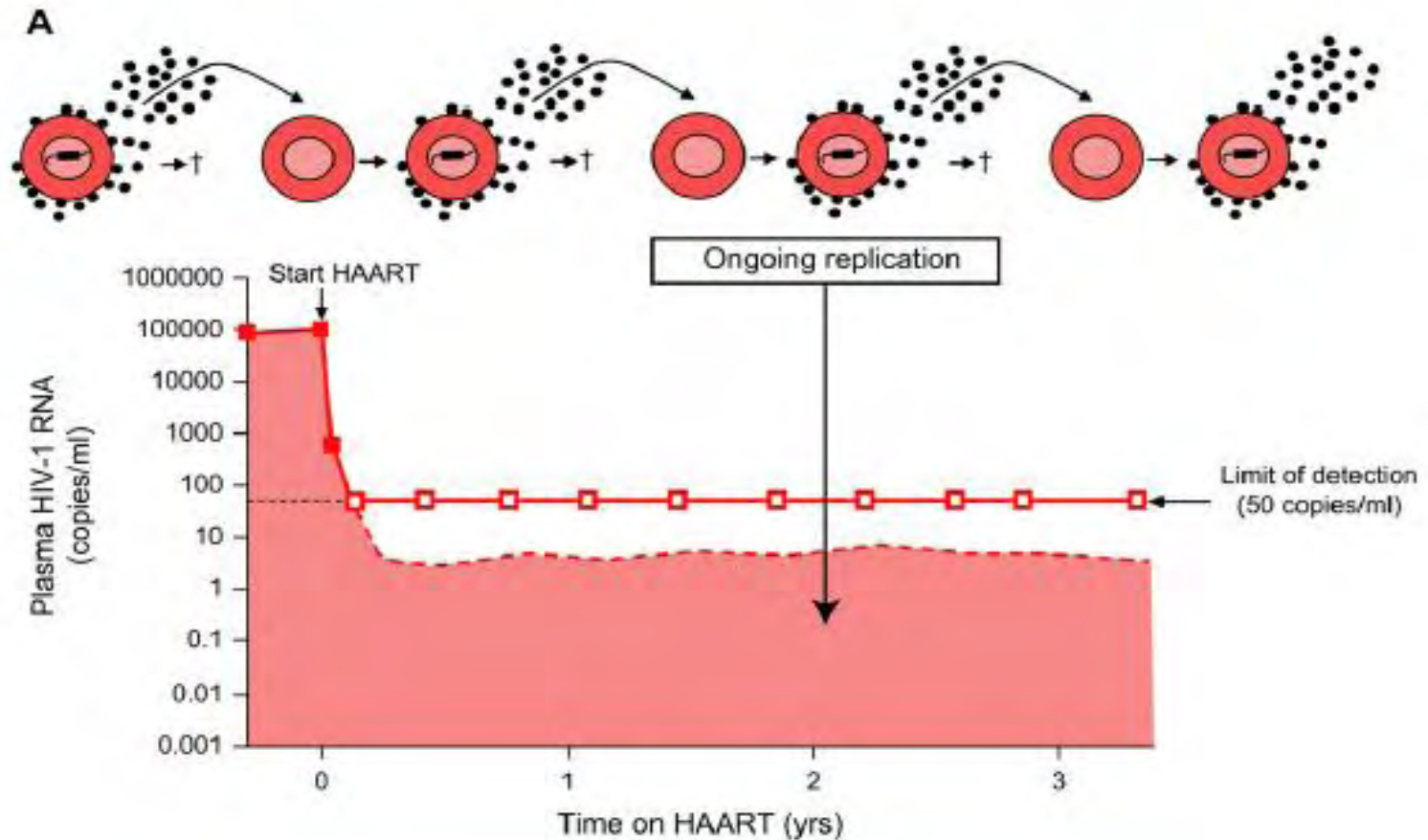
Dynamique du réservoir viral: PCR < 500 copies, 1996



Dynamique de la virémie résiduelle: Modèle à 4 phases avec dernière phase stable (PCR < 1 copie, 2008)

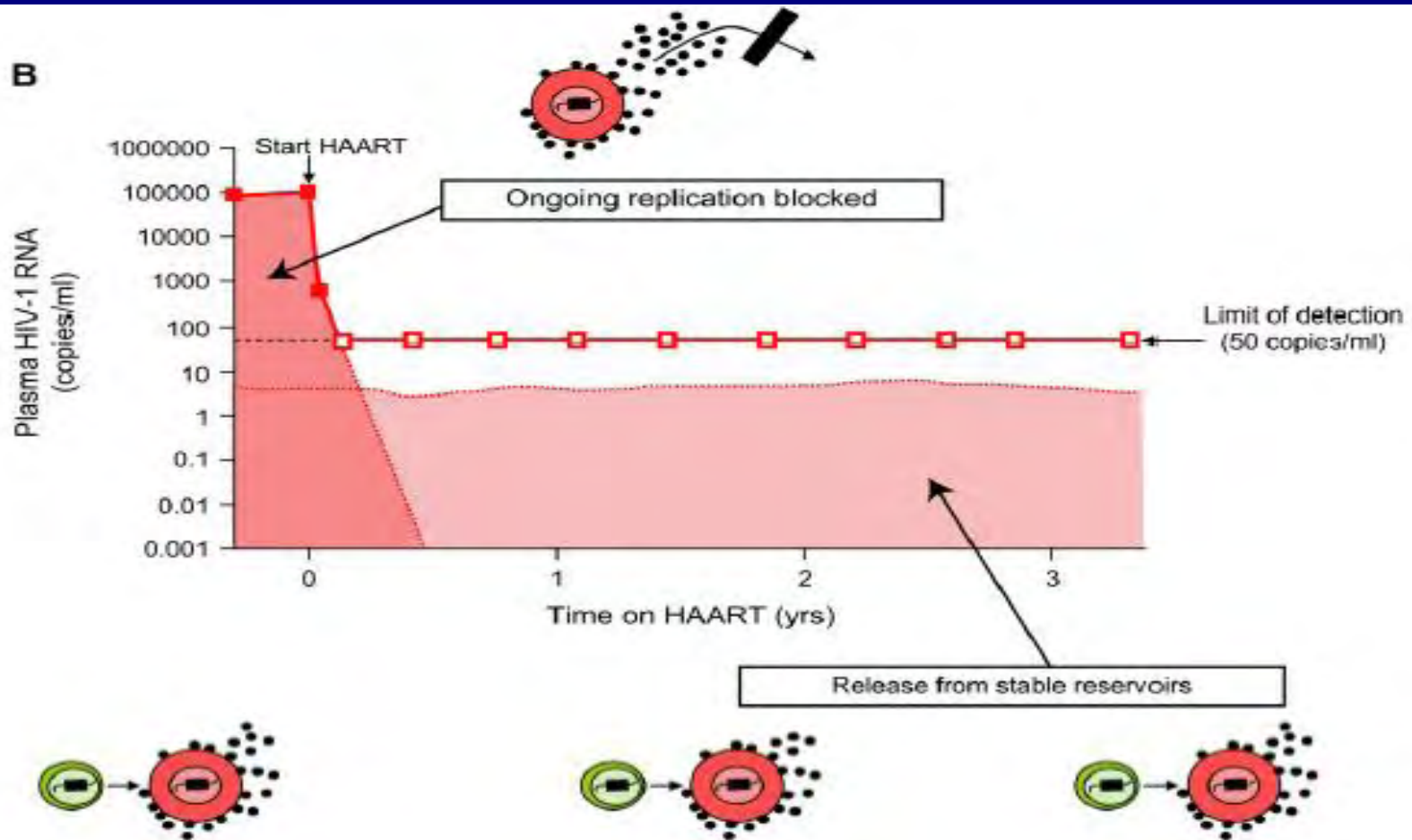


Modèle #1: Réplication résiduelle

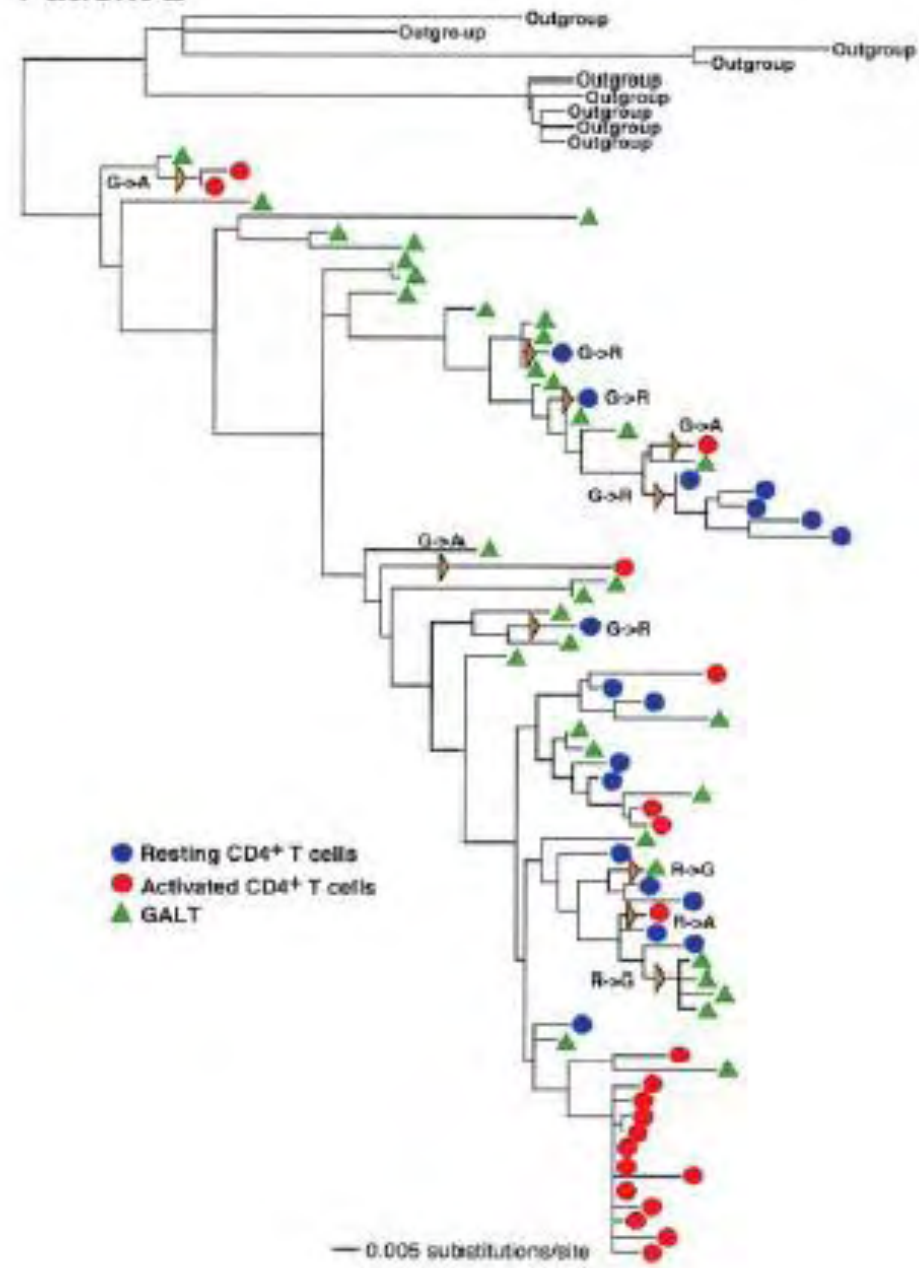


Modèle #2: Relarguage des réservoirs

B

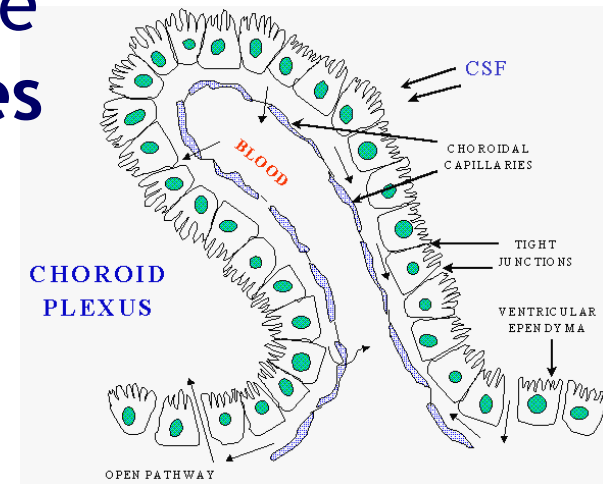
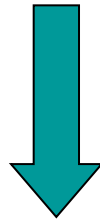


Patient 2



Réservoirs anatomiques du VIH

- cellules cibles (co-récepteur, tropisme)
 - réponse immune locale
 - barrières anatomiques



Notion de SANCTUAIRE

structure où le VIH échappe au traitement du fait d'une mauvaise diffusion des ARV

Questions

- Virémie résiduelle
 - Réalité ?
 - Peut on intervenir ?
 - Impact des ARVs ?
 - Conséquences sur la résistance ?
 - Conséquences sur la clinique ?
- Où est le réservoir ?

Intensification des traitements: Pas d'effet sur la virémie

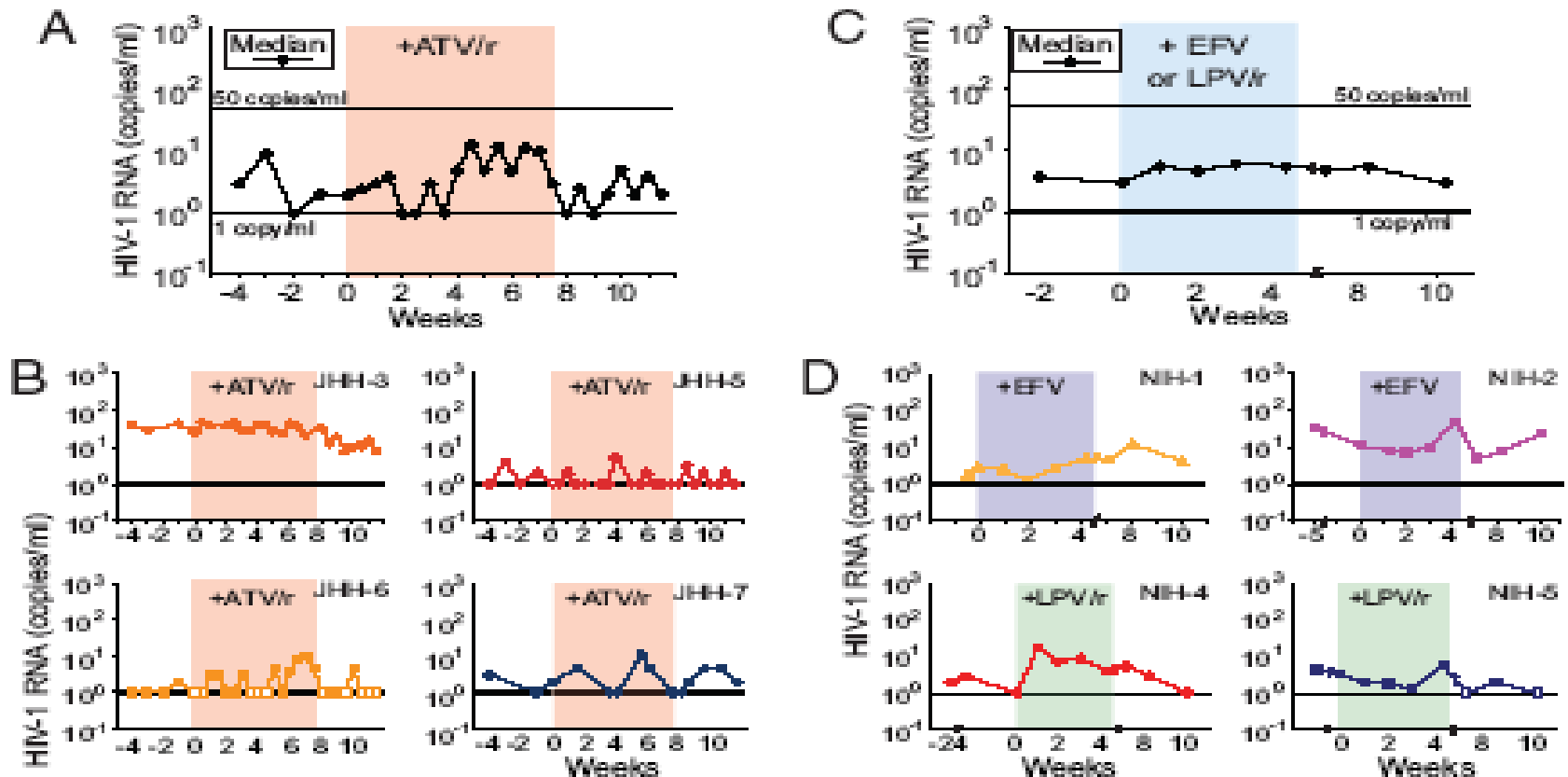


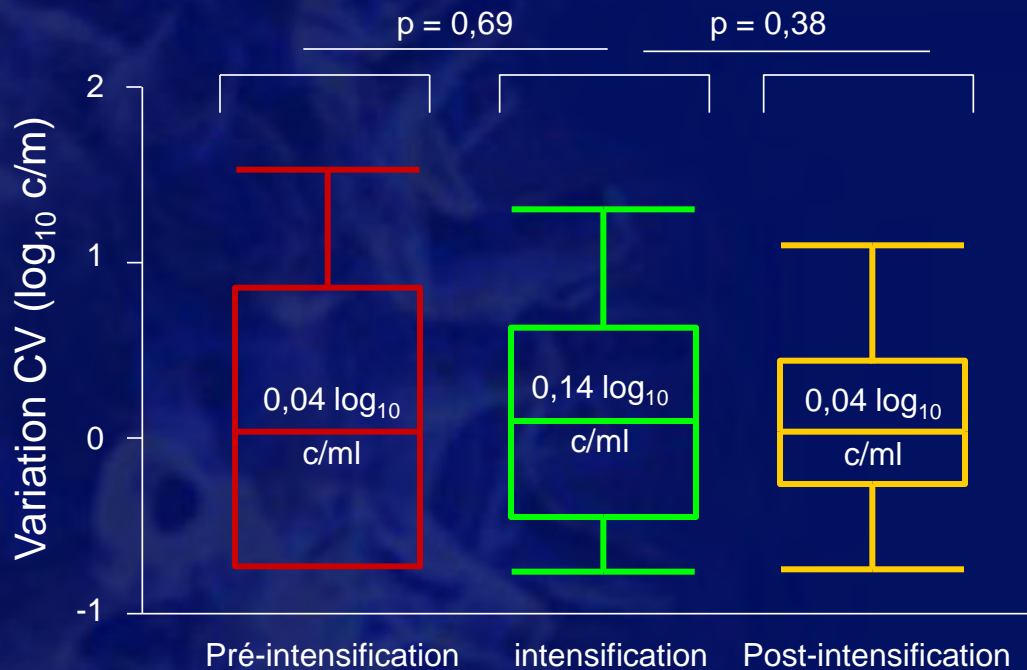
Fig. 1. Intensification does not reduce residual viremia in patients on ART. (A) Median HIV-1 RNA levels of the 5 JHH patients at multiple sampling points before, during, and after intensification with ATV/r. (B) Levels of viremia in the JHH patients intensified with ATV/r. (C) Median HIV-1 RNA levels of the 4 NIH patients at multiple sampling points before, during, and after intensification with EFV and LPV/r. (D) Levels of viremia in NIH patients intensified with either EFV or LPV/r.

HIV-1 RNA assay single copy sensitivity
Therapeutic drug concentration assessed

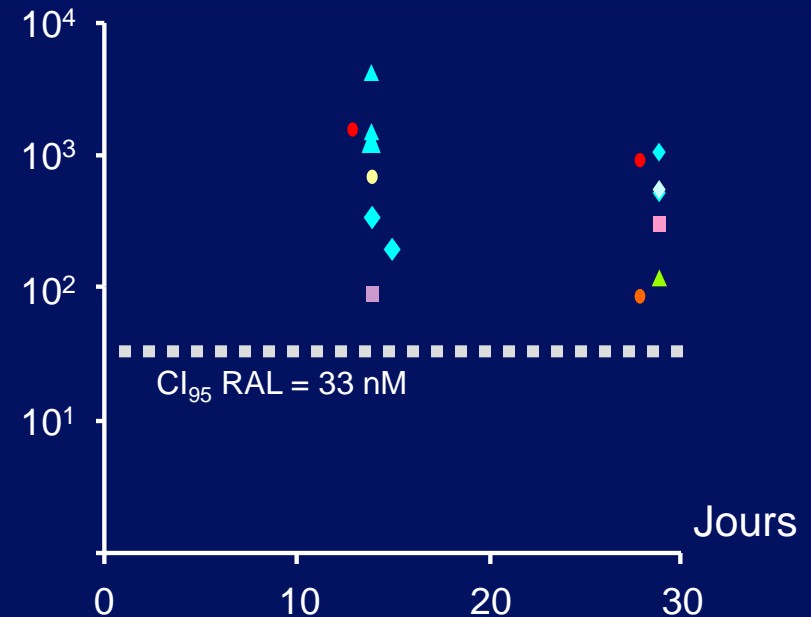
Dinso JB et al. PNAS 2009;106:9403

Intensification par RAL : absence de diminution de la virémie résiduelle

Évolution des CV médianes

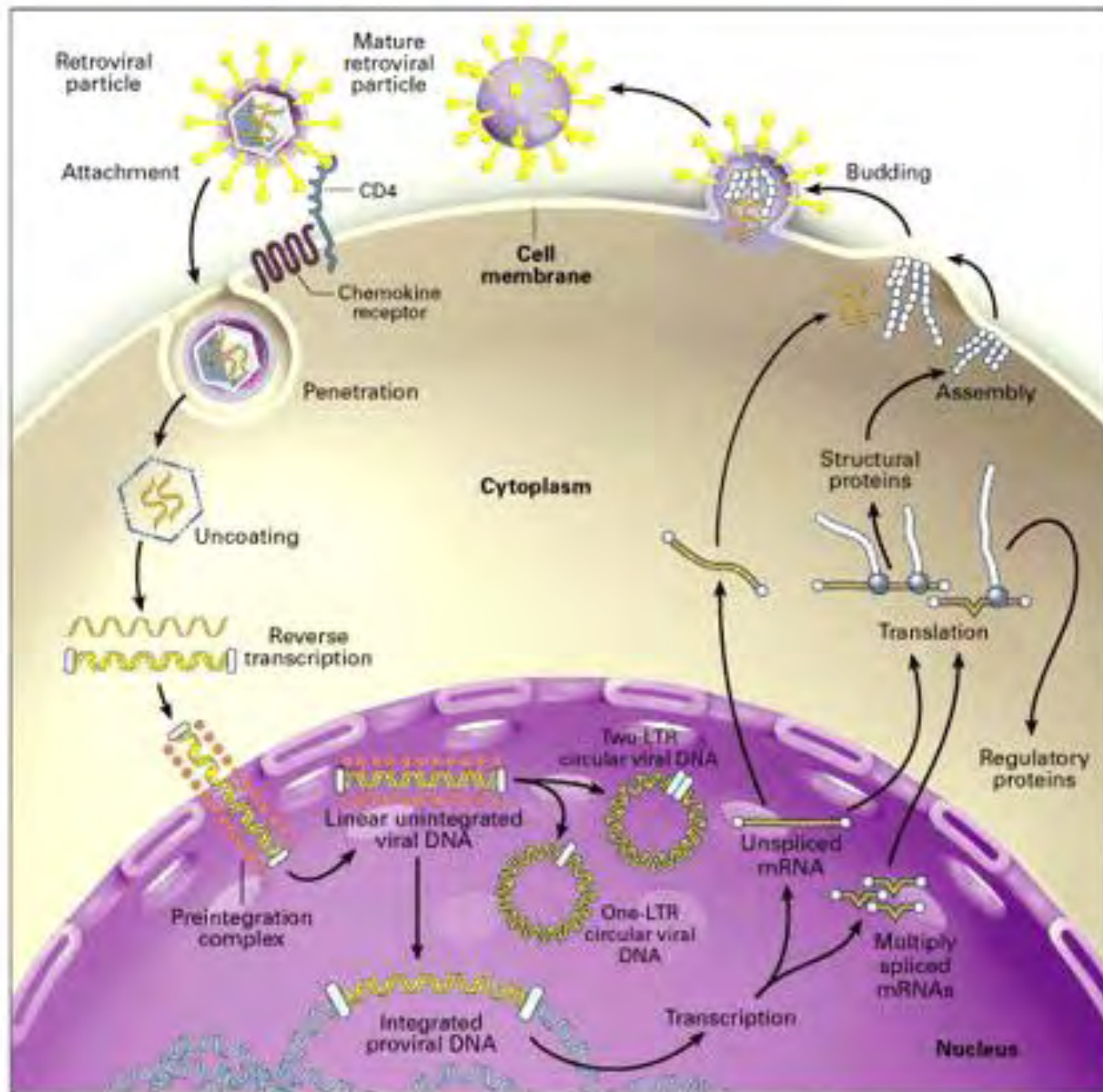


RAL (nM)



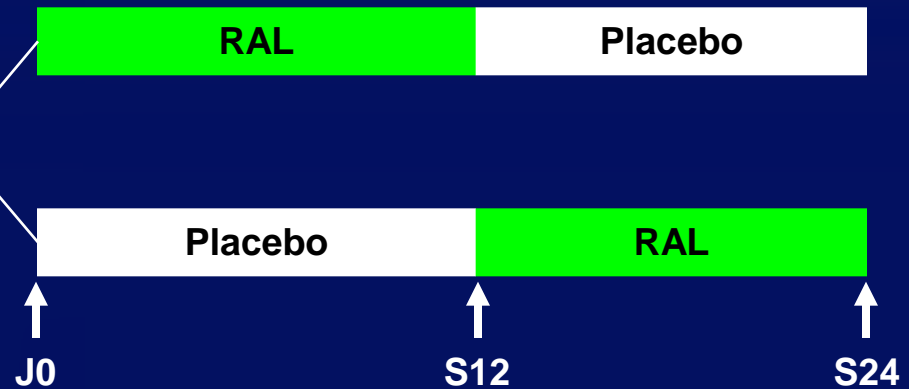
Moyenne C_{\min} RAL : 1001 nM
(extrêmes : 79-3847)

- Les virémies résiduelles ne proviennent donc probablement pas de cycles réplicatifs complets ?
- Le traitement ARV seul, même avec intensification par RAL, ne peut pas aboutir à l'élimination des réservoirs



Intensification par RAL : pas d'augmentation des cercles 2-LTR (ACTG A5244) (1)

Patients VIH sous ARV
CV pré-ARV > 100 000 c/ml
CV < 50 c/ml depuis au moins 6 mois
CV ultrasensible (CVus) > 1 c/ml



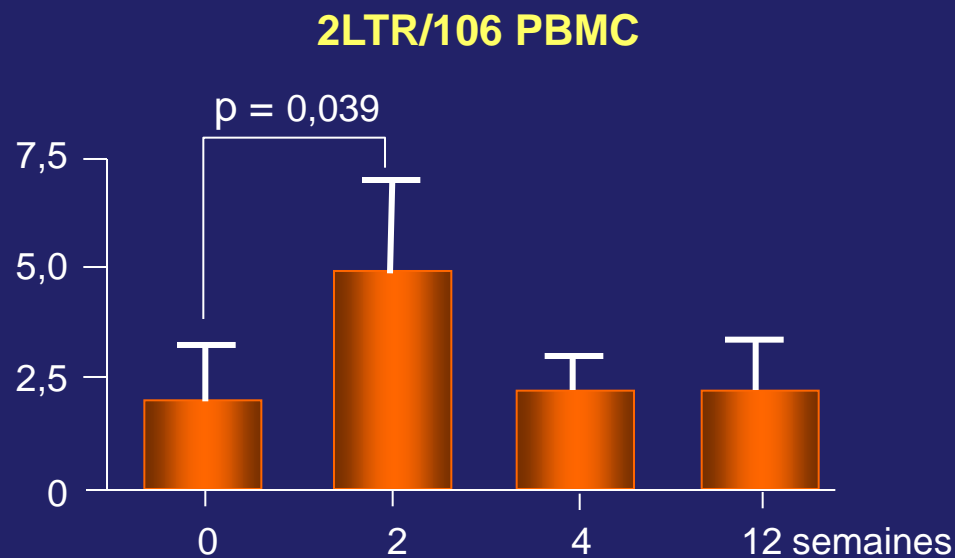
- **Mesures à J0, S12 et S24**
 - CV ultrasensible (seuil 0,2 c/ml)
 - % d'activation CD4 et CD8 (co-expression de CD38 et HLA-DR)
 - cercles 2-LTR (ADN épisomal VIH extrait de 5×10^6 PBMC et quantifié par RT-PCR)
 - ADN VIH total
- **Sur les 103 patients potentiellement éligibles et screenés avec CVus :**
64 avaient un ARN VIH détectable par CVus et 39 non détectable
2 éléments prédictifs du niveau de CV :
 - les patients les plus jeunes (< 46 ans) ont la CVus la plus basse (0,2 vs 0,75 c/ml, $p = 0,004$)
 - les patients ayant une 1^{ère} CV < seuil de détection depuis + de 2 ans ont une CVus plus basse (0,2 vs 2,3 c/ml, $p = 0,016$)

Intensification par RAL : pas d'augmentation des cercles 2-LTR (ACTG A5244) (3)

- **Données durant l'intensification par RAL**
 - pas de réduction de l'ARN VIH (CVus)
 - pas d'effet sur cercles 2-LTR à S12 (n'exclut pas un effet à des temps plus précoces)
 - pas de changement sur ADN proviral
 - pas de changement sur l'activation CD4 et CD8
- **Conclusions**
 - absence d'effet d'une intensification par RAL sur les marqueurs direct (ARN VIH) et indirects (cercles 2-LTR, activation T) de la réplication virale
 - ceci suggère une réplication limitée ou nulle sous ARV
 - des stratégies ciblant directement les cellules infectées latentes semblent plus propices à une éradication qu'une tentative d'intensification

Intensification par RAL : cinétique de l'ADN épisomal VIH-1

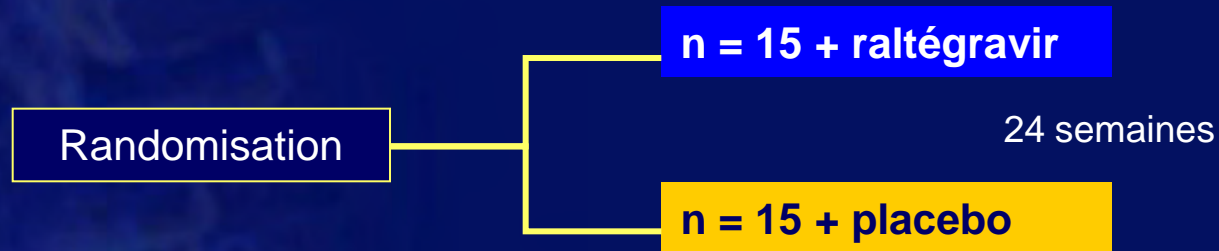
- Intensification par RAL de 44 patients avec CV < 50 c/ml depuis plus d'un an sous HAART
- Augmentation transitoire de l'ADN circulaire non intégré (2LTR)



- Origine de cette augmentation : détournement du cycle de production viral par l'inhibiteur d'intégrase
- À partir des cellules infectées de façon latente ou de cycles de réplication résiduelle ?

Intensification par RAL chez des patients discordants viro-immunologiques : absence d'effet sur des marqueurs virologiques et immunologiques

- 30 patients ayant depuis au moins un an CV < 40 c/ml sous HAART et CD4 < 350/mm³

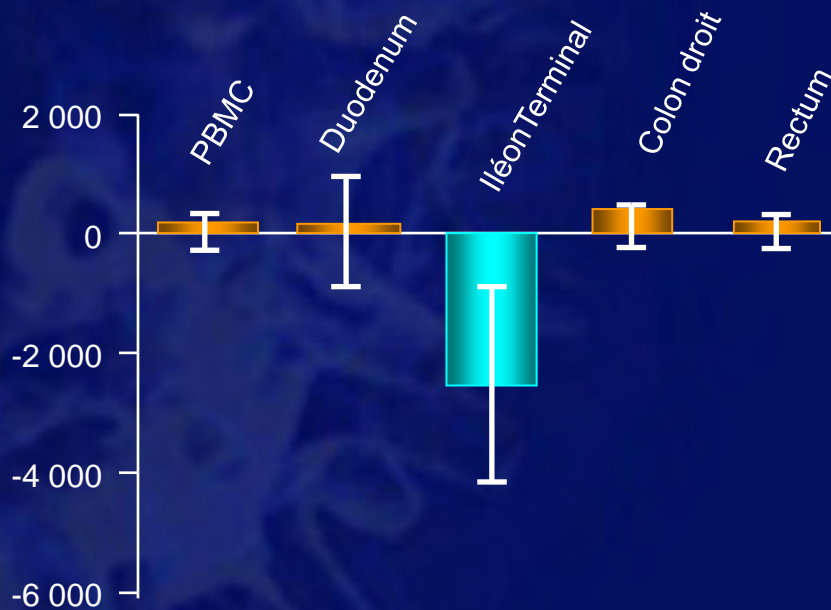


- Pas d'effet de l'intensification par RAL (vs placebo) sur
 - La CV plasmatique ultrasensible (< 1 c/ml)
 - L'ADN proviral et l'ARN VIH intracellulaire dans le sang
 - L'activation CD4 et CD8 dans le sang et le tube digestif
 - Les cellules T spécifiques VIH dans le sang et le tube digestif

Intensification par RAL : charge virale et activation cellulaire T dans le tractus digestif

- Intensification par RAL \pm EFV ou DRV/r chez 7 patients avec charge virale < 40 c/ml. Endoscopies à J0 et S12

Evolution de l'ARN VIH-1 non épissé dans différents sites (copies/ 10^6 cellules CD4)



- Diminution de l'ARN VIH-1 au niveau de l'iléon (5/7 patients)
- Stabilité dans le plasma et dans les autres sites du tube digestif
- Diminution de l'activation cellulaire TCD8 et augmentation des cellules CD4 au niveau iléal

- L'iléon pourrait être le siège d'une réplication VIH persistante sous ARV

Ultrasensitive Assessment of Residual HIV Viraemia in HAART-Treated Patients With Persistently Undetectable Plasma HIV-RNA: A Cross-Sectional Evaluation

Stefano Bonora,^{1*} Emanuele Nicastrì,² Andrea Calcagno,¹ Daniel Gonzalez de Requena,¹ Gabriella D'Etto, ³ Loredana Sarmati,⁴ Lucia Palmisano,⁵ Vincenzo Vullo,³ Giovanni Di Perri,¹ and Massimo Andreoni¹

TABLE I. Baseline Characteristics of Patients (n = 154)

Age (years) ^a	42 (10.5)
Females, n (%)	51 (33.1)
Risk factors, n (%)	
Homo-bisexual	60 (39.0)
Heterosexual	64 (41.5)
Intravenous drug use	30 (19.5)
Years from HIV diagnosis ^a	6 (4.68)
HAART duration (years) ^a	3.4 (2.08)
Duration of virological suppression <50 copies/ml (months) ^a	28.6 (17.8)
Nadir CD4+ cell count (cells/mm ³) ^a	269 (194)
Nadir CD4+ cells (%) ^a	17 (10.5)
Current CD4+ cell count (cells/mm ³) ^a	569 (255)
Current CD4+ cells (%) ^a	29.7 (9.9)
Gain in CD4+ cell count (cells/mm ³) ^{a,b}	229 (238.5)
Gain in CD4+ cells (%) ^{a,b}	10.9 (10.6)
On first-line ARV regimen, n (%)	97 (63.4)
Third drug of current HAART regimen, n (%)	
Nevirapine	48 (31.2)
Efavirenz	57 (37.0)
Lopinavir/ritonavir	49 (31.8)

ARV, antiretroviral; HAART, highly active ARV therapy.

^aMean (SD) values.

^bGain in CD4+ cell count from initiation of HAART to time of study sampling.

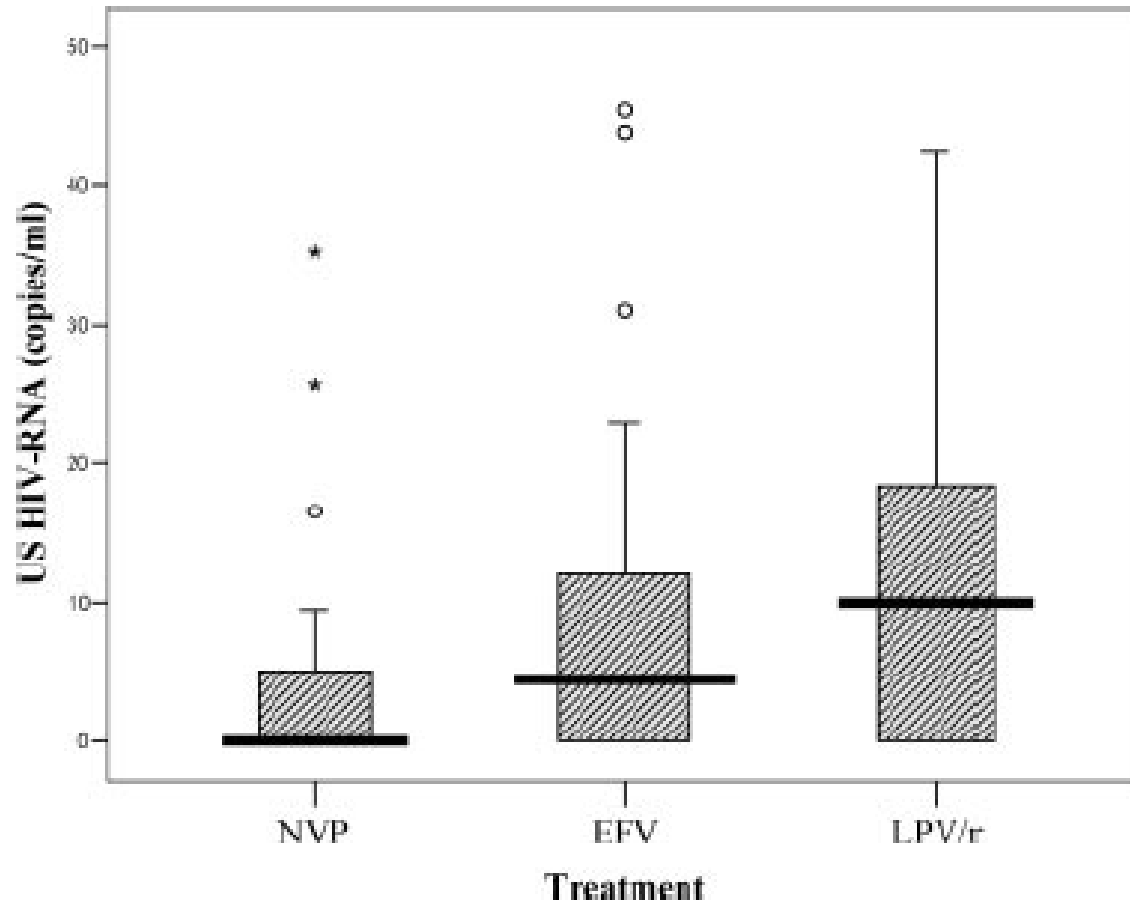


TABLE II. Univariate and Multivariate Analysis of Factors Significantly Associated With Level of Ultrasensitive HIV-RNA

Factors associated with level of US HIV-RNA ^a	Univariate analysis	Multivariate analysis	
	<i>P</i> -value	<i>P</i> -value	95% CI ^b
Gender	0.46		
Thymidine analogue-containing backbone On first-line ARV regimen	0.07 0.42	0.31	0.262–1.539
Duration of virological suppression <50 copies/ml (months) HAART duration	0.03 0.96	0.85	0.377–2.240
Nadir CD4+ cell count (cells/mm ³)	0.01	0.17	0.303–1.246
Nadir CD4+ cells (%)	0.01	0.27	0.334–1.360
Current CD4+ cell count (cells/mm ³)	0.91		
Gain in CD4+ cell count (cells/mm ³) ^c	0.87		
Third drug of current HAART regimen	0.02 ^d		
Nevirapine		0.013	0.189–0.821
Efavirenz		0.54	0.594–2.909
Lopinavir/ritonavir		0.08	0.911–5.171

ARV, antiretroviral; HAART, highly active ARV therapy.

^aUltrasensitive HIV-RNA measurement (detection limit: 2.5 copies/ml).

^b95% confidence interval.

^cGain in CD4+ cell count from initiation of HAART to time of study sampling.

^dANOVA test.

Lower residual plasma viremia associated with the use of nevirapine

Stéphanie HAÏM-BOUKOBZA¹, Laurence MORAND-JOUBERT², Philippe FLANDRE¹, Nadia VALIN⁴, Slim FOURATI¹, Sophie SAYON¹, Marc LAVIGNON³, Anne SIMON⁵, Pierre-Marie GIRARD⁴, Christine KATLAMA⁶, Vincent CALVEZ¹, Anne-Geneviève MARCELIN^{1*}

AIDS 2010

Table 1. Population characteristics and factors associated to a VL<1 cp/ml in univariate and multivariate analysis.

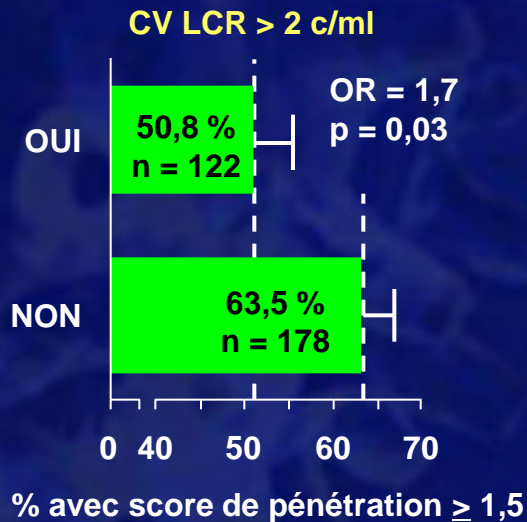
Comparison of populations characteristics				Factors associated to a VL<1 cp/ml		
Population parameters Median (IQR)	NVP group (n=75)	EFV group (n=90)	P-value	Univariate analysis	Multivariate analysis	
				P-value	P-value	Odds Ratio
Age (years)	47.0 (42-55)	44.0 (36-50)	0.0019	0.31		
Sex (% male)	72	75.6	0.72			
Time since HIV diagnosis (years)	13.5 (9.5-18.9)	8.4 (4.1-14.0)	<0.0001	0.10		
CD4 cell count (cell/mm ³)	660 (554-828)	535 (359-763)	0.0013	0.91		
CD4 rate (%)	33 (27-39)	29 (25-37)	0.11			
CD4 nadir (cell/mm ³)	244 (165-338)	239 (178-325)	0.88	0.79		
Number of ARV therapeutic lines	4 (3-6)	2 (1-4)	<0.0001	0.21		
TDF/FTC/NNRTI-treatment duration (years)	3.4 (1.8-4.2)	2.8 (1.3-3.7)	0.086	0.54		
Duration of VL<50 cp/ml under TDF/FTC/NNRTI-treatment (years)	2.8 (1.6-4.0)	2.3 (1.1-3.2)	0.034	0.22		
Duration of VL<50 cp/ml under any ARV regimen (years)	5.9 (3.2-9.6)	3.6 (1.2-7.7)	0.0009	0.0003	0.005	2.07 [1.3-3.5]
Total duration of ARV therapy (years)	10.8 (6.6-13.2)	6.1 (2.7-17.3)	<0.0001	0.07		
NVP vs. EFV (VL<1 cp/ml)	61/75 (81.3%)	50/90(55.6%)	<0.001	0.0006	0.005	2.85 [1.4-6.1]

IQR, Inter Quartile Range; NVP, nevirapine; EFV, efavirenz; VL, viral load; TDF, tenofovir; FTC, emtricitabine; NNRTI, Non Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitor.

CV restant détectable dans le LCR sous HAART : cohorte CHARTER

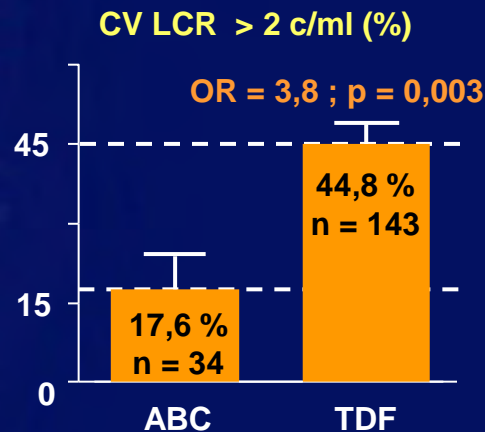
- À partir de la cohorte CHARTER, sélection de 300 patients sous HAART avec CV < 50 c/ml dans le plasma et le LCR
- Avec test ultrasensible, la CV est détectable (entre 2 et 50 c/ml) dans 41 % des échantillons de LCR

CV détectable dans LCR associée à score de pénétration des ARV plus bas (1,5 vs 1,7 ; $p = 0,03$) et à séronégativité pour le VHC ($p = 0,03$)

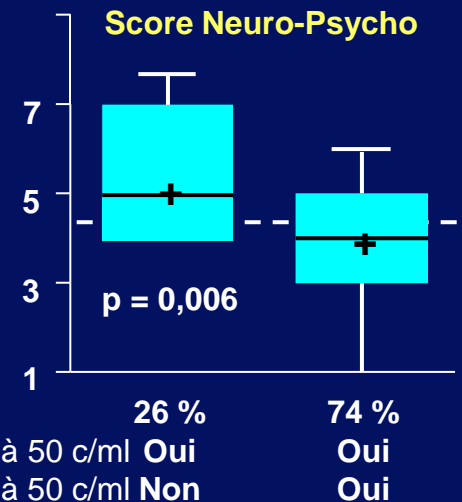


CV détectable dans le LCR associée à traitement en cours par

- TDF (vs ABC, OR = 3,8 ; $p = 0,003$)
- FTC (vs 3TC, OR = 2,1 ; $p = 0,01$)
- EFV (vs NVP, OR = 3,4 ; $p = 0,04$)



CV indétectable dans le plasma mais pas dans le LCR : associé à une performance neuropsychique plus mauvaise



Conclusion : les patients sous ARV avec CV plasmatique indétectable peuvent avoir des troubles neuro-cognitifs en raison d'un faible niveau de CV résiduelle dans le LCR, ceci étant possiblement dû à un score de pénétration insuffisant des ARV dans le LCR

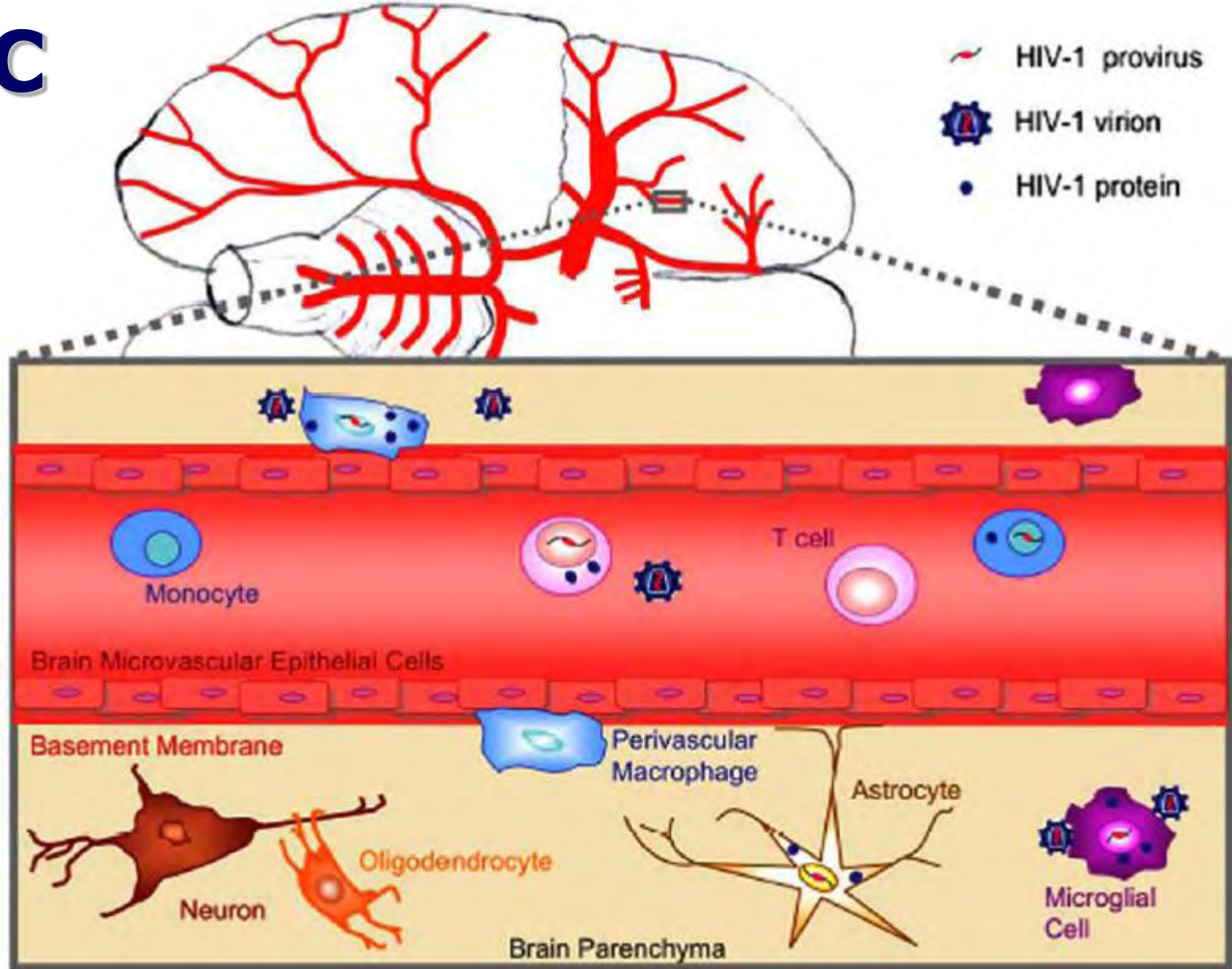
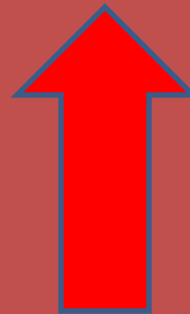
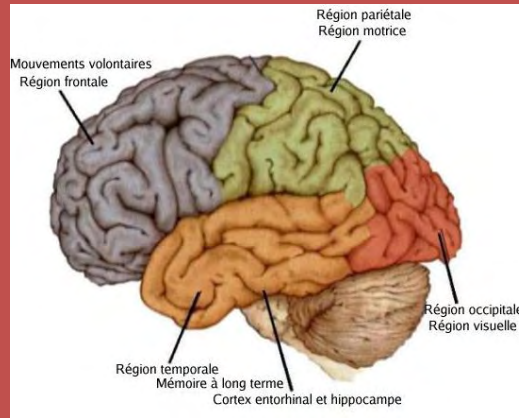
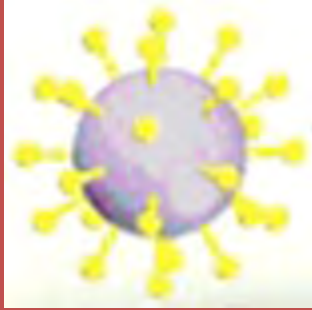


Fig. (3). Cellular HIV-1 reservoirs in the CNS

Perivascular macrophages and microglia are the major HIV-1 producing cells in the CNS.

HIV-1 infection of astrocytes is considered to be non-productive.

Divergence génétique chez patients avec encéphalites VIH



RNA plasma
< 50 cop/ml



RNA plasma
> 50 cop/ml





MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA)

Koichiro Tamura,† Joel Dudley,* Masatoshi Nei,‡ and Sudhir Kumar§**

*Center for Evolutionary Functional Genomics, The Biodesign Institute, Arizona State University; †Department of Biological Sciences, Tokyo Metropolitan University, Tokyo, Japan; ‡Department of Biology and the Institute of Molecular Evolutionary Genetics, The Pennsylvania State University; and §School of Life Sciences, Arizona State University

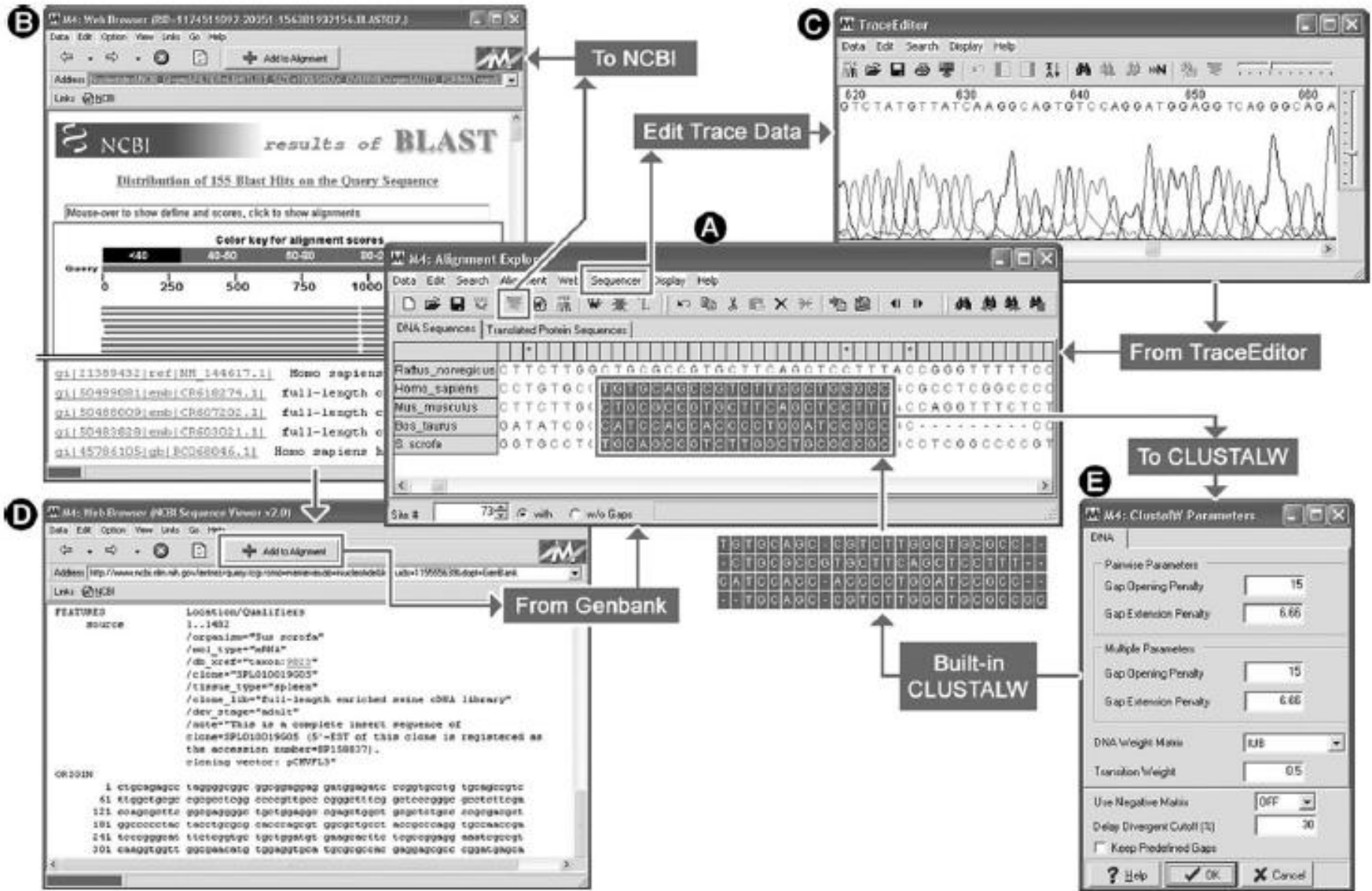


Figure 1. Integration of BLAST, TraceEditor, Alignment Explorer, and ClustalW.

Valeur diagnostique du niveau de la charge virale dans le LCR
*Distance génétique entre souches virales du plasma et du LCR
chez des sujets présentant ou non une encéphalite à VIH (1)*

- **Charge virale dans le LCR et aide au diagnostic d'encéphalite à VIH:**
 - Le niveau de la charge virale dans le LCR est un peu plus élevé de 0,5 log chez les patients avec encéphalite (4,2 log) à VIH par rapport à ceux présentant un trouble neurologique d'autre origine (3,3 log) ($p=0.05$) mais sans que l'on puisse déterminer un seuil utilisable pour le diagnostic.
 - En revanche le ratio charge virale LCR/plasma est fortement indicateur d'une encéphalite VIH ($p=0.0006$).
 - Ratio = 11.1 chez les patients avec encéphalites VIH
 - Ratio = 0.7 chez les patients présentant un trouble neurologique d'autre origine

Distance génétique entre souches virales du plasma et du LCR chez des sujets présentant ou non une encéphalite à VIH (2)

- **Diversité génétique entre les virus du sang et du LCR chez les patients avec encéphalites à VIH**
 - La distance génétique a été calculée entre les virus du sang (plasma quand charge virale plasmatique détectable et cellulaire quand charge virale plasmatique indétectable)
 - La distance génétique entre virus du sang et du LCR était plus basse chez des patients présentant une charge virale plasmatique > 40 cop/ml que chez ceux présentant une charge virale plasmatique indétectable (P=0.03)
- => chez les patients qui ont une PCR positive dans le LCR et une charge virale indétectable dans le plasma ceci est en faveur d'une répllication autonome dans le SNC (grande distance génétique entre virus du sang et virus du LCR)
- => chez les patients avec PCR positive dans le LCR et dans le plasma ceci est en faveur d'un passage de virus du sang vers le SNC (faible distance génétique entre virus du sang et du LCR)

Distance génétique entre souches virales du plasma et du LCR chez des sujets présentant ou non une encéphalite à VIH (3)

- **Effet du traitement sur la distance génétique**

- Le score de pénétration des ARVs (CPE Charter) et le nombre des molécules théoriquement active sur le virus du LCR (GSS calculé sur les résultats du test génotypique de résistance dans le LCR)
- En revanche, si on applique le score de Charter corrigé à l'aide des résultats du test de résistance:
 - => plus le score de CHARTER corrigé est élevé et plus la distance génétique est faible (ceci indiquant un effet positif du traitement qui réduit la diversité génétique et empêche la réplication autonome entre sang et SNC P=0.007)

Is low-grade systemic inflammation due to residual HIV infection?

Jean-Philippe Bastard, Cathia Soulié, Soraya Fellahi, Philippe Flandre, Anne Simon, Christine Katlama, Vincent Calvez, Anne-Geneviève Marcelin, Jacqueline Capeau

INSERM U938, Université Pierre et Marie Curie, Hôpital Tenon, Paris, France
INSERM U943, UPMC, Hôpital Pitié-Salpêtrière, Paris France
Department of Internal Medicine, Hôpital Pitié-Salpêtrière, Paris France

Increased inflammatory markers in well-controlled HIV-infected patients as compared to the general population In the SMART study

Table 3. Biomarkers Levels in SMART Study Participants Receiving Antiretroviral Therapy (ART) Who Had an HIV RNA Level ≤ 400 Copies/mL and Percentage Differences in Levels Versus CARDIA and MESA Study Participants, as Cited in Table 2

Biomarker	Participants 33–44 years of age			Participants 45–76 years of age		
	No.	Median level (IQR)	% Diff. (<i>P</i>)	No.	Median level (IQR)	% Diff. (<i>P</i>)
hsCRP, $\mu\text{g/mL}$	140	2.13 (0.77–5.20)	40.2 (<.001)	293	2.83 (1.07–6.80)	37.8 (<.001)
IL-6, pg/mL	139	1.89 (1.15–3.42)	39.0 (<.001)	291	2.64 (1.55–4.14)	60.1 (<.001)
D-dimer, $\mu\text{g/mL}$	140	0.21 (0.15–0.46)	NA	293	0.29 (0.17–0.57)	49.1 (<.001)
Cystatin C, mg/dL	86	0.90 (0.78–0.97)	NA	130	1.00 (0.86–1.16)	20.9 (<.001)

NOTE. Data are the median level and (interquartile range [IQR]). CARDIA, Coronary Artery Development in Young Adults; Diff., difference; MESA, Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis; NA, not available; SMART, Strategies for Management of Anti-Retroviral Therapy.

In HIV-infected patients, inflammation is related to risk of cardiovascular disease and death

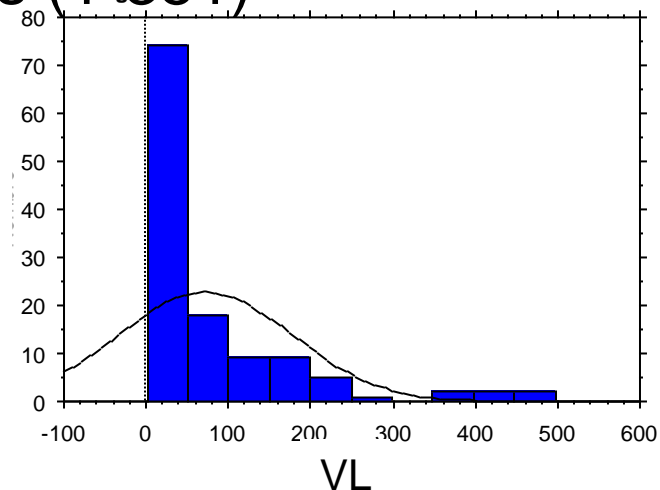
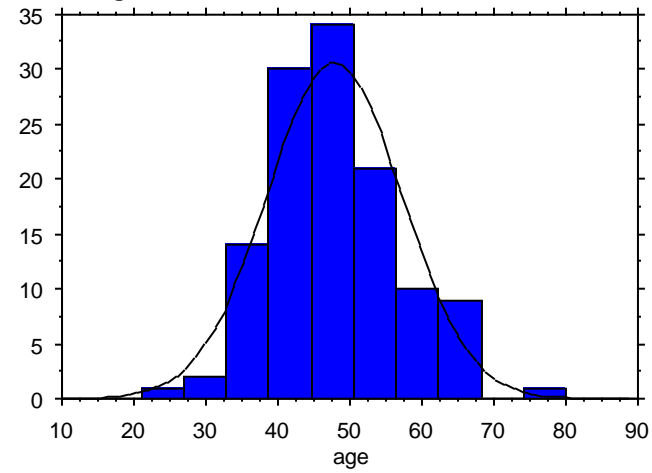
- ✓ CRP and Myocardial Infarction (*Triant JAIDS 2009*)
- ✓ CRP and IL6 and deaths (*SMART, Kuller Plos Med 2008*)
- ✓ CRP and death (*FRAM Tien JAIDS 2010*)

Aim of the study: To evaluate the role of residual HIV infection in systemic inflammation

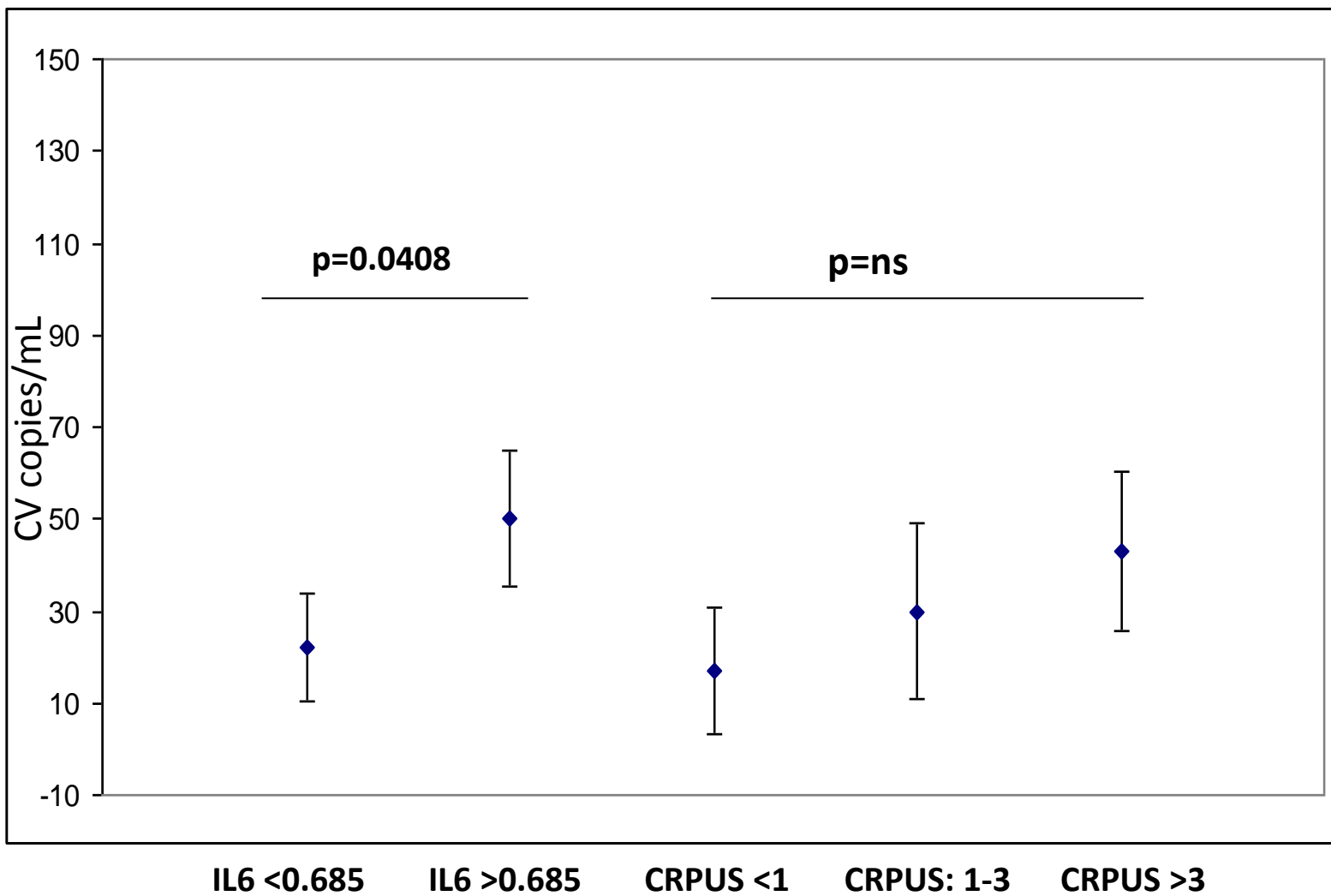
- Search for relationships between low-level HIV viral loads and systemic inflammatory markers in well-controlled ART-treated patients
- Transversal study performed in Pitié-Salpêtrière and Saint-Antoine Hospitals in Paris, Departments of infectious diseases and internal medicine
- VL in the virology Department of Pitié-Salpêtrière hospital
- CRP and cytokine essays in the Biochemistry department of Tenon Hospital

Patients

- 122 patients, 98 men (80.3%)
- Median age: 47y (range 21-80y)
- BMI: 23.3kg/m² (16.9-34)
- CD4: 519 cells/mm³ (212-1389)
- nadir CD4: 180 cells/mm³ (1-891)
- ART duration: 126 months (1-250):
 - ✓ NRTI: 112 patients (92%), NNRTI: 32 (26%), PI: 88 (72%), RAL: 15 (12%), MCV: 7 (6%), T20: 1
- known duration of infection: 162 months (1-351)
- Stade C: 30 patients (25%)
- **Viral Load: <1 to 500 copies/ml**
- **Median VL: 28 copies/ml (1-497)**

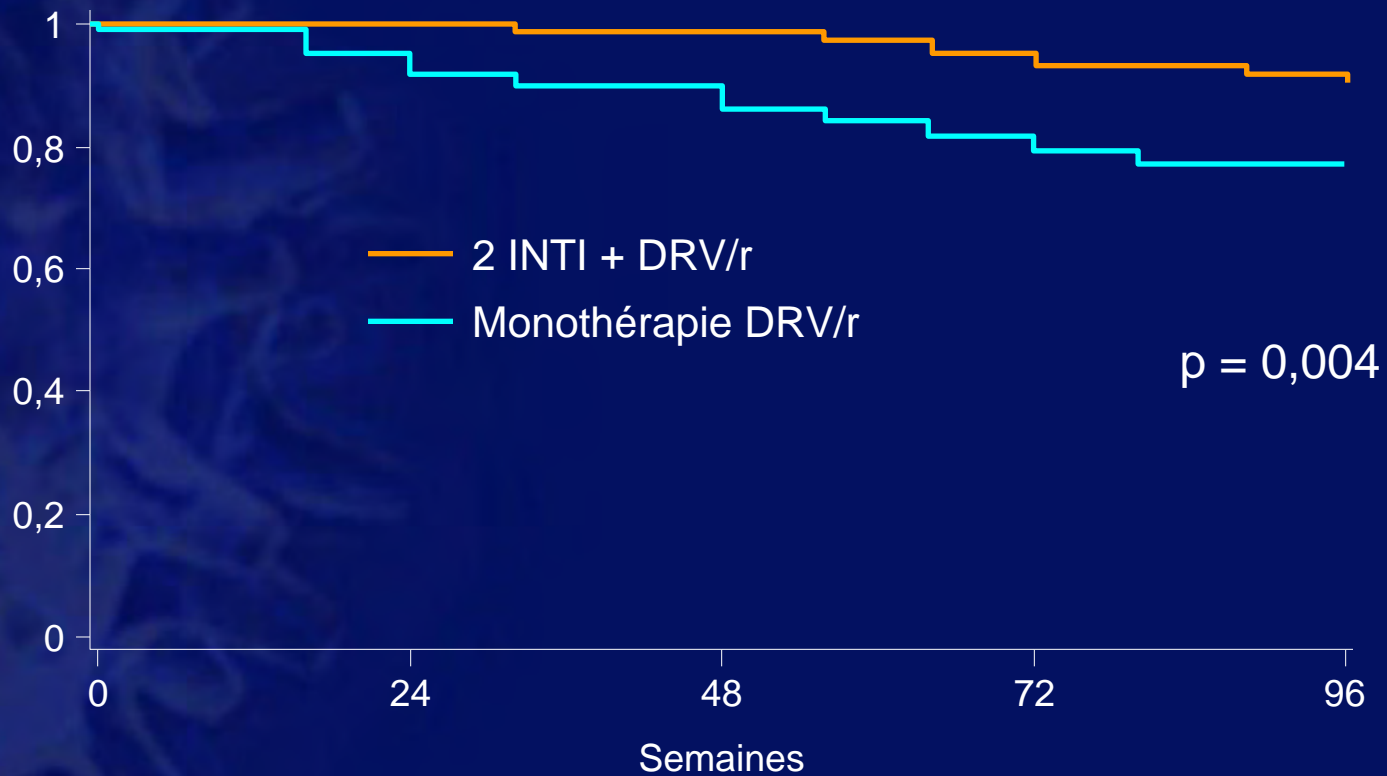


Results



Essai MONOI : facteurs prédictifs de l'échec virologique de la monothérapie de DRV/r bid (1)

Proportion de patients sans rebond virologique
(2 CV consécutives > 50 c/ml)



Essai MONOI : facteurs prédictifs de l' échec virologique de la monothérapie de DRV/r bid (2)

Analyse multivariée : facteurs associés au rebond virologique dans le bras de monothérapie de DRV/r

	A S48		A S96	
	OR (IC 95 %)	p	OR (IC 95 %)	p
CV < 1 c/ml à J0	0,24 (0,05 - 0,86)	0,042	-	
CV > 50 c/ml à J0	7,84 (1,22 - 52,2)	0,025	-	
Observance non optimale (< 100 %)	-		3,84 (1,29 - 12,49)	0,02
Durée traitement ARV antérieur (par 5 ans d' augmentation)	-		2,93 (1,43 - 6,66)	0,006
ADN VIH-1 à J0 (par log ₁₀ c/10 ⁶ cellules) *	-		2,66 (1,11 - 7,48)	0,04

* ADN VIH (log₁₀ c/10⁶ cellules) : 4,2 si rebond virologique vs 3,9 si pas de rebond

Financements



Collaborative HIV and Anti-HIV Drug Resistance Network

WP1 Basic Science V Calvez AG Marcelin

WP2 Clinical Science D Descamps

Résistance aux antirétroviraux

- Pr Vincent Calvez
- Dr AG Marcelin
- Dr L Morand-Joubert
- Dr Marc Wirden
- Dr Isabelle Malet
- Dr Cathia Soulié
- Dr Sidonie Lambert
- Dr Slim Fourati
- Dr Stéphanie Boukobza
- Sophie Sayon

Stratégie thérapeutique

- Pr Christine Katlama
- Dr Marc-Antoine Valantin
- Dr Roland Tubiana
- Dr Luminata Schneider
- Dr Hocine Aït Mohand
- Dr Fabienne Caby
- Dr Cyrille Clavel
- Rachid Agher

Epidémiologie et statistiques

- Dr Dominique Costagliola
- Dr Philippe Flandre



Immunologie PSL

- Pr Brigitte Autran
- Dr Guislaine Carcelain

Médecine interne PSL

- Dr Manuela Bonmarchand
- Dr Anne Simon

Maladies infectieuses St Antoine

- Pr PM Girard
- Dr JL Meynard
- Dr N Valin

Pharmacologie BCB

- Dr Gilles Peytavin

Bochimie TNN

- Pr J Capeau
- Dr JP Bastard

AC 5 : ANRS essais thérapeutiques
AC 11: ANRS virologie médicale