

## DESCRIPTION DE L'ÉTUDE

### **TITRE : CELLULES DENDRITIQUES RALDH2+ ET PERSISTANCE DES RESERVOIRS DU VIH DANS LES CELLULES T CD4+ REACTIVES/SPECIFIQUES AUX BACTERIES/CHAMPIGNONS**

**1. RATIONNEL :** Le VIH-1 cause une infection chronique caractérisée par la déplétion massive des lymphocytes T-CD4+ (LTCD4), des altérations profondes de l'intégrité de la barrière muqueuse intestinale (translocation microbienne) et subséquemment du microbiote locale (dysbiose). La dysbiose est caractérisée par la prépondérance des souches bactériennes/fongiques causant des infections opportunistes (*e.g. Staphylococcus aureus (SA), Prevotella stercorea (PS), Candida albicans (CA)*). Les cellules cibles du VIH sont les LTCD4 mémoires et les cellules myéloïdes telles que les cellules dendritiques (DC). En plus de leur rôle dans l'immunité anti-VIH, les DC facilitent l'infection des LTCD4 au niveau de la synapse immunologique *via* le mécanisme de *trans* infection. Les réservoirs du VIH persistent à long terme dans les LTCD4 mémoires malgré des traitements antirétroviraux (ARV) efficaces, et la réplication virale reprend dès l'arrêt du traitement. De plus, les ARV ne bloquent pas la transcription du VIH, permettant une réplication virale résiduelle dans certains tissus, tels que la muqueuse intestinale. La réplication virale résiduelle, ensemble avec la translocation microbienne et la dysbiose sont une source d'activation immunitaire chronique et une barrière contre la guérison. L'expansion clonale des LTCD4 mémoires agissant comme les réservoirs du VIH est dépendante de l'interaction avec les DC dans le cadre du processus de présentation antigénique. Alors qu'un lien entre la spécificité antigénique des LTCD4 et leur permissivité à l'infection par le VIH a été, en partie, documenté<sup>[1]</sup>, la spécificité antigénique des clones LTCD4 qui portent les réservoirs du VIH sous ARV reste, quant à elle, inconnue. Notamment, des LTCD4 spécifiques aux bactéries/champignons prédominent dans la circulation/tissus<sup>[2]</sup>, mais leur contribution à la persistance des réservoirs du VIH demeure incertaine. Finalement, l'identification des signaux fournis par les DC ayant présenté des antigènes bactériens/fongiques et menant à la réactivation transcriptionnelle des réservoirs du VIH représente aussi un axe de recherche prioritaire.

**Études préliminaires:** Compte tenu du fait que les monocytes représentent une source importante de précurseurs de DC, des propriétés pro-inflammatoires des monocytes CD16+ et de leur expansion lors de l'infection à VIH, notre attention fut concentrée sur les DC dérivées des monocytes (MDDC) CD16+ vs. CD16-. À travers des études transcriptomiques, nous avons identifié l'enzyme rétinol déhydrogénase 2 (RALDH2) comme marqueur fonctionnel des MDDC CD16+ (Wacleche et al. Blood Advances, 2018)<sup>[3]</sup>. La RALDH2 métabolise la vitamine A en acide rétinoïque (AR), un métabolite qui induit le tropisme intestinal des LTCD4. De façon importante, notre groupe a démontré que l'AR augmente la permissivité à l'infection par le VIH et la réactivation des réservoirs viraux dans les LTCD4 à polarisation Th17<sup>[4]</sup>. Nous avons aussi démontré la capacité supérieure des MDDC CD16+ vs. CD16- à transmettre le VIH aux LTCD4 spécifiques au SA, bactérie gram-positif, connue pour sa capacité à induire l'activité RALDH2 via la voie du TLR2<sup>[5]</sup>. Cette capacité des MDDC à transmettre le VIH aux LTCD4 SA-spécifiques était dépendante de l'activité RALDH2, comme démontré par l'utilisation de l'inhibiteur de la RALDH2, le *N,N-diéthylaminobenzaldehyde (DEAB)*, ou de l'antagoniste du récepteur à l'AR (RARA), le LE540 (Cattin *et al.*, 2019, manuscrit en préparation).

**2. HYPOTHESE :** Les MDDC CD16+ avec activité RALDH2 contribuent à l'établissement et la réactivation des réservoirs du VIH dans les LTCD4 mémoires spécifiques à des composants bactériens/fongiques, tels que SA, PS et CA, qui sont capables d'induire l'activité RALDH2 *via* le TLR2.

**3. OBJECTIFS :** L'objectif global de ce projet est d'identifier les mécanismes par lesquels les MDDC contribuent à l'établissement, la persistance et à la réactivation des réservoirs viraux sous ARV, via le processus de présentation antigénique, dans des LTCD4 à tropisme intestinal et spécifiques aux composants bactériens/fongiques prédominants dans le microbiote des sujets VIH+ sous ARV. Les objectifs spécifiques sont décrits ci-dessous :

#### **4. METHODOLOGIE**

**OBJECTIF 1:** Documenter la persistance du VIH dans les LTCD4 spécifiques aux bactéries/champignons chez les individus VIH+ recevant un traitement antirétroviral (ARV).

**Objectif 1.1. Comparer la fréquence des LTCD4 circulants spécifiques/réactifs aux SA, PS, CA, CMV, et VIH chez les sujets VIH+ vs. VIH-**. Les expériences seront réalisées en triplicatas avec les monocytes isolés à partir de PBMC des sujets infectés (VIH+) traités ou non avec ARV et aussi de PBMC des sujets non-infectés (VIH-) à l'aide des billes magnétiques, comme décrit précédemment<sup>[3]</sup>. Les monocytes seront différenciés en DC en présence de GM-CSF (*granulocytes et macrophages colony stimulating factor*) et d'IL-4 (*interleukin 4*). Les MDDC seront chargées en antigène (lysate cellulaire de SA, PS et CA produits au laboratoire, *via* une collaboration avec la Dre. Cara Wilson [University of Colorado, USA]), puis co-cultivées avec des LTCD4 autologues chargés en CFSE (Carboxyfluorescein succinimidyl ester). SEB (*Staphylococcal enterotoxin B*) et CMV (*cytomegalovirus*) seront utilisés respectivement comme contrôles de la stimulation polyclonale et de la réponse antivirale de type Th1. La fréquence des LTCD4 proliférant en réponse aux antigènes après 5 jours (CFSE<sup>low</sup>) sera analysée par cytométrie en flux, comme décrit précédemment<sup>[6]</sup>. En parallèle, les LTCD4 spécifiques aux antigènes seront identifiés sur la base de l'expression de CD154/CD40L, CD69 et TNF (*tumor necrosis factor*) membranaire<sup>[6-8]</sup>. Taille de l'échantillon: Nous allons bénéficier des échantillons de PBMC des sujets VIH+ de la cohorte de Primo infection. Pour des comparaisons transversales, un minimum de n=20 sujets par groupe seront inclus. Pour des comparaisons longitudinales (avant et après ARV), un minimum de n=10 sujets appariés par groupe seront inclus. La taille de l'échantillon a été déterminée sur la base de nos résultats préliminaires publiés<sup>[9, 10]</sup>.

**Objectif 1.2. Quantifier les réservoirs du VIH dans les LTCD4 spécifiques aux SA, PS, CA, CMV, et VIH.** Les LTCD4 proliférant en réponse aux antigènes dans les co-cultures avec les MDDC, seront identifiés comme décrit dans 1.1. et isolés par cytométrie en flux (BDARIAII, laboratoire de confinement niveau 3). Les LTCD4 spécifiques au CMV (set peptidique CMV-pp65 (Miltényi)), connus pour leur faible permissivité à l'infection par le VIH<sup>[1]</sup>, seront utilisés comme contrôles négatifs. Les LTCD4 spécifiques au VIH seront utilisés comme contrôles positifs<sup>[1]</sup>, avec un set de peptides du VIH (*NIH AIDS Reagents Program*)<sup>[6]</sup>. Les co-cultures MDDC:LTCD4 seront réalisées en présence d'ARV pour prévenir la transmission de cellule-à-cellule du VIH *in vitro*. L'ADN viral intégré sera quantifié par PCR nichée en temps réel<sup>[4]</sup>, et le virus répliquatif par **viral outgrowth assay** (VOA)<sup>[4, 10]</sup>. Taille de l'échantillon: Nous allons utiliser des PBMC, déjà acquises dans notre banque de cellules au laboratoire, issues de leucaphères collectées des sujets VIH+ sous ARV (n=10).

**OBJECTIF 2: Déterminer le rôle de l'enzyme RALDH2 dans la réactivation des réservoirs du VIH chez les individus VIH+ sous ARV.** Les expériences seront réalisées avec des cellules de donneurs VIH+ sous ARV. L'activité RALDH2 est induite dans les DC par le zymosan, un ligand du TLR2<sup>[5]</sup>. Le zymosan sera utilisé comme contrôle positif dans nos études. L'activité RALDH2 sera quantifiée par cytométrie en flux (Aldefluor Assay) après stimulation des MDDC avec les antigènes et le VIH THRO, une souche virale de type « *transmitted/founder* ». La production d'AR sera mesurée par ELISA (MyBiosource).

**Objectif 2.1. Valider l'activité RALDH2 comme marqueur fonctionnel des MDDC CD16+ chez les personnes VIH+ sous ARV.** Les MDDC CD16+/CD16- seront générées comme décrit précédemment<sup>[3]</sup>. L'activité RALDH2 sera mesurée dans les MDDC après exposition aux SA, PS, CA, zymosan, peptides VIH ou CMV-pp65. Le rôle de l'activité RALDH2 et de la production de l'AR dans la transmission du VIH par les MDDC aux LTCD4 spécifiques aux antigènes sera déterminé en utilisant l'inhibiteur DEAB et l'antagoniste du récepteur de l'AR, le LE540.

**Objectif 2.2. Évaluer la capacité des MDDC RALDH+ à induire la réactivation des réservoirs dans les LTCD4 spécifiques aux SA, PS et CA.** Des co-cultures MDDC:LTCD4 seront réalisées en présence des antigènes ci-dessus mentionnés, en absence d'ARV pour permettre la réactivation/réplication virale *in vitro*, et en présence/absence du DEAB et du LE540. La réplication virale sera quantifiée par ELISA.

## 5. ANALYSES ET RESULTATS ANTICIPÉS :

Des calculs statistiques de type non-paramétrique, apparié pour les études longitudinales (test de Wilcoxon ou test de Friedman) et non-apparié pour les études transversales (test de Mann-Whitney ou test de Kruskal-Wallis) seront réalisés avec le logiciel GraphPad pour identifier des différences significatives entre les groupes si les différences existent. L'accès à des PBMC de sujets VIH- et VIH+ sous

ARV est assuré *via* une collaboration avec le Dr. Jean-Pierre Routy (CSUM) et également via la cohorte de Primo infection. D'autres cohortes, telles que la cohorte VIH de vieillissement/maladies cardiovasculaires (dirigées par Drs. C. Tremblay et M. Durand) seront disponibles au besoin. Toutes les techniques nécessaires pour réaliser ce projet ont déjà été mises au point au sein du laboratoire et sont fonctionnelles. Ce projet se base sur des résultats préliminaires inclus dans deux manuscrits, dont un publié en 2018<sup>[3]</sup> et un autre en préparation pour soumission imminente<sup>[11]</sup>. Le CRCHUM offre toutes les plateformes techniques requises pour la réalisation du projet. Nos résultats attendus ont le potentiel d'identifier la spécificité antigénique des LTCD4 portant le réservoir du VIH répliatif sous ARV et d'identifier l'enzyme RALDH2 comme nouvelle cible thérapeutique visant à limiter l'établissement et la réactivation des réservoirs du VIH. L'identification des pathogènes bactériens/fongiques promouvant l'activité RALDH2 dans les DC et l'expansion clonale des LTCD4 permettra d'améliorer la prise en charge des patients pour prévenir les infections opportunistes/rétablir la dysbiose. Les résultats attendus nous emmèneront à tester, par la suite, des inhibiteurs de RALDH2 (*e.g.* Disulfiram) dans des modèles précliniques. Ce savoir est essentiel pour comprendre les mécanismes de persistance du VIH et la mise en place des nouvelles stratégies d'éradication. Ce financement permettra d'assurer la fin du projet de thèse d'Amélie Cattin, étudiante au doctorat dans mon laboratoire (09/2015-08/2020) sous ma responsabilité. Ces résultats feront le sujet d'un manuscrit à soumettre en début de l'année 2020.

#### **Bibliographie :**

1. Saharia KK, Koup RA. **T cell susceptibility to HIV influences outcome of opportunistic infections.** *Cell* 2013; 155(3):505-514.
2. Hegazy AN, West NR, Stubbington MJT, Wendt E, Suijker KIM, Datsi A, et al. **Circulating and Tissue-Resident CD4(+) T Cells With Reactivity to Intestinal Microbiota Are Abundant in Healthy Individuals and Function Is Altered During Inflammation.** *Gastroenterology* 2017; 153(5):1320-1337 e1316.
3. Wacleche SW, Cattin A, Fonseca do Rosario N, Goulet JP, Gauchat D, Cleret-Buhot A, et al. **CD16+ monocytes give rise to CD103+RALDH2+TCF4+ dendritic cells with unique transcriptional and immunological features.** *Blood Advances* 2018; In press.
4. Planas D, Zhang Y, Monteiro P, Goulet JP, Gosselin A, Grandvaux N, et al. **HIV-1 selectively targets gut-homing CCR6+CD4+ T cells via mTOR-dependent mechanisms.** *JCI Insight* 2017; 2(15).
5. Manicassamy S, Ravindran R, Deng J, Oluoch H, Denning TL, Kasturi SP, et al. **Toll-like receptor 2-dependent induction of vitamin A-metabolizing enzymes in dendritic cells promotes T regulatory responses and inhibits autoimmunity.** *Nat Med* 2009; 15(4):401-409.
6. Wacleche VS, Chomont N, Gosselin A, Monteiro P, Goupil M, Kared H, et al. **The colocalization potential of HIV-specific CD8+ and CD4+ T-cells is mediated by integrin beta7 but not CCR6 and regulated by retinoic acid.** *PLoS One* 2012; 7(3):e32964.
7. Chattopadhyay PK, Yu J, Roederer M. **A live-cell assay to detect antigen-specific CD4+ T cells with diverse cytokine profiles.** *Nat Med* 2005; 11(10):1113-1117.
8. Haney D, Quigley MF, Asher TE, Ambrozak DR, Gostick E, Price DA, et al. **Isolation of viable antigen-specific CD8+ T cells based on membrane-bound tumor necrosis factor (TNF)-alpha expression.** *J Immunol Methods* 2011; 369(1-2):33-41.
9. Gosselin A, Monteiro P, Chomont N, Diaz-Griffero F, Said EA, Fonseca S, et al. **Peripheral blood CCR4+ CCR6+ and CXCR3+ CCR6+ CD4+ T cells are highly permissive to HIV-1 infection.** *J Immunol* 2010; 184(3):1604-1616.
10. Gosselin A, Wiche Salinas TR, Planas D, Wacleche VS, Zhang Y, Fromentin R, et al. **HIV persists in CCR6+CD4+ T cells from colon and blood during antiretroviral therapy.** *AIDS* 2017; 31(1):35-48.
11. Cattin A, Wacleche VS, Fonseca do Rosario N, Goulet JP, Gauchat D, Gosselin A, et al. **CD16+ monocyte-derived dendritic cells promote HIV reservoir reactivation in Staphylococcus aureus-specific CD4+ T-cells in a RALDH-dependent manner.** *Nature communications* 2018; To be submitted March 2019.

## **6. ÉCHEANCIER**

Les études proposées dans ce projet de recherche seront réalisées dans une période de 12 mois. Nous allons commencer avec les études dans l'objectif #1 lors des premiers 3 mois (mois 1-3). Nous allons démarrer l'objectif #2 à partir du 4<sup>e</sup> mois et nous anticipons compléter cet objectif au bout de 9 mois (mois 4-12).

### BUDGET ET JUSTIFICATIONS BUDGETAIRES

*Le budget doit être réaliste, les justifications budgétaires doivent clairement indiquer l'impact de la subvention du Réseau sur la pérennité du projet. Cette section ne doit pas excéder **1 page**.*

Ce financement de 15,000\$ couvrira une partie du budget nécessaire à la réalisation du projet proposé. Plus précisément ce budget couvrira le coût des cultures cellulaires et des analyses par cytométrie en flux prévues dans l'objectif #1 et les dépenses de tri cellulaire par cytométrie en flux des cellules spécifiques aux antigènes proposés et des PCR en temps réel dans l'objectif #2.

Le reste des dépenses sera couvert, en partie, par des fonds des IRSC, en collaboration avec CANFAR et l'IAS, fonds obtenus par mon laboratoire dans le cadre de la collaboration pancanadienne CanCURE 1.0 (04/2014-03/2019).

Ce financement du réseau FRQ-S-MI/SIDA servira de levier important pour faire une nouvelle demande de fonds en septembre 2019 pour soutenir nos priorités de recherche dans le domaine des réservoirs du VIH en vue d'identifier des nouvelles stratégies d'éradication basée sur des évidences scientifiques.

Objectif	Nature de la dépense	Coût
Objectif #1	<b>Matériel pour la culture cellulaire</b> milieu de culture, plastique de culture, cytokines recombinantes, peptides, sérum	<b>5,000\$</b>
	<b>Analyse en cytométrie en flux (Fortessa)</b> n=20 VIH- ; n=20 VIH+ART ; n=10 VIH+ avant/après ART. Total n=60 échantillons. 40\$/heure ; 40 heures d'acquisition nécessaires	<b>1,600\$</b>
Objectif #2	<b>Tri cellulaire par cytométrie en flux (BDARIAIII, niveau de confinement 3)</b> n=10 VIH+ART ; 5h de tri par sujet ; 100\$/par heure ; 50heures de tri nécessaires en total	<b>5,000\$</b>
	<b>PCR en temps réel</b> Enzymes, mix, plastique, courbe standard	<b>3,400 \$</b>
<b>TOTAL</b>		<b>15,000\$</b>



POUR USAGE INTERNE

Date d'évaluation :

Acceptation

Raisons du refus :

Signature :

Refus :

### CRITÈRES DE SÉLECTION

	Impact potentiel	Intervalle	Mérite scientifique
<b>Subventionnable</b>	Extrêmement important	4,5 – 4,9	Exceptionnel
	Très important	4,0 – 4,4	Excellent
	Important	3,5 – 3,9	Excellent, mais peut nécessiter une révision
<b>Non subventionnable</b>	Modéré	3,0 – 3,4	Très bien, mais nécessite une révision pour être subventionnable
	Limité	2,5 – 2,9	Révision importante nécessaire
	Négligeable	0,0 – 2,4	Laisse beaucoup à désirer
<p><i>Il est proposé aux évaluateurs d'accorder une note (0,0 à 4,9) pour chacun des critères, en vue de les additionner et de les diviser par 6.</i></p>			
<b>1. RATIONNEL</b> <i>(Mise en contexte et importance de l'étude proposée)</i>		4.5	
<b>2. HYPOTHÈSE</b> <i>(Veuillez énoncer clairement l'hypothèse principale du projet et les hypothèses secondaires, le cas échéant).</i>		4.0	
<b>3. OBJECTIFS</b> <i>(Veuillez spécifier les objectifs principaux, et les objectifs secondaires, le cas échéant).</i>		4.0	
<b>4. MÉTHODOLOGIE</b> <i>(Si des outils ou des méthodologies innovantes seront utilisées pour ce projet, veuillez les spécifier ici. Veuillez préciser la faisabilité, les difficultés potentielles et les mesures d'atténuation, lorsque pertinent)</i>		4.5	
<b>5. ANALYSES ET RÉSULTATS ANTICIPÉS</b> <i>(Veuillez préciser les méthodes statistiques qui seront utilisées et énoncer les résultats attendus).</i>		4.0	
<b>6. ÉCHÉANCIER</b> <i>(Veuillez identifier les étapes à suivre pour l'atteinte des objectifs.)</i>		4.2	
<b>INSCRIRE LE CODE RS DU PARTICIPANT : RS-006</b>		<b>TOTAL = 4.20</b>	
<p><b>FORCES :</b> EXPERTISE, RÉSULTATS PRÉLIMINAIRES, IMPORTANCE DE SUJET</p>			
<p><b>FAIBLESSES :</b> ÉTUDES IN VITRO</p>			

RS-006

**CRITÈRES DE SÉLECTION**

	<b>Impact potentiel</b>	<b>Intervalle</b>	<b>Mérite scientifique</b>
<b>Subventionnable</b>	Extrêmement important	4,5 – 4,9	Exceptionnel
	Très important	4,0 – 4,4	Excellent
	Important	3,5 – 3,9	Excellent, mais peut nécessiter une révision
<b>Non subventionnable</b>	Modéré	3,0 – 3,4	Très bien, mais nécessite une révision pour être subventionnable
	Limité	2,5 – 2,9	Révision importante nécessaire
	Négligeable	0,0 – 2,4	Laisse beaucoup à désirer
<i>Il est proposé aux évaluateurs d'accorder une note (0,0 à 4,9) pour chacun des critères, en vue de les additionner et de les diviser par 6.</i>			
<b>1. RATIONNEL</b> <i>(Mise en contexte et importance de l'étude proposée)</i>		4.5	
<b>2. HYPOTHÈSE</b> <i>(Veuillez énoncer clairement l'hypothèse principale du projet et les hypothèses secondaires, le cas échéant).</i>		4.5	
<b>3. OBJECTIFS</b> <i>(Veuillez spécifier les objectifs principaux, et les objectifs secondaires, le cas échéant).</i>		4.5	
<b>4. MÉTHODOLOGIE</b> <i>(Si des outils ou des méthodologies innovantes seront utilisées pour ce projet, veuillez les spécifier ici. Veuillez préciser la faisabilité, les difficultés potentielles et les mesures d'atténuation, lorsque pertinent)</i>		4.2	
<b>5. ANALYSES ET RÉSULTATS ANTICIPÉS</b> <i>(Veuillez préciser les méthodes statistiques qui seront utilisées et énoncer les résultats attendus).</i>		4.2	
<b>6. ÉCHÉANCIER</b> <i>(Veuillez identifier les étapes à suivre pour l'atteinte des objectifs.)</i>		3.9	
<b>INSCRIRE LE CODE RS DU PARTICIPANT : RS-006</b>		<b>TOTAL = 4.3</b>	
<b>FORCES :</b>  <b>THIS WAS A STRONG PROPOSAL TO STUDY AN IMPORTANT TOPIC IN THE AREA OF HIV RESERVOIRS. METHODS AND APPROACHES THAT WILL BE USED ARE IN PLACE. THE PROJECT HAS POTENTIAL FOR CLINICAL RELEVANCE. THE POSSIBILITY OF USING QVOA TO QUANTIFY REPLICATION COMPETENT VIRUS IS MENTIONED. WHILE THIS IS A STRENGTH, IT RAISES QUESTIONS RELATING TO FEASIBILITY IN TERMS OF CELL AVAILABILITY, TERM OF THE GRANT AND COSTS WITHIN THE CONTEXT OF THIS \$15,000 GRANT OPPORTUNITY.</b>			
<b>FAIBLESSES :</b>			



THE PROJECT IS NOT REALLY A PILOT PROJECT  
SAMPLE SIZE CALCULATION ISSUES ARE SOMEWHAT VAGUE.  
VERY AMBITIOUS OBJECTIVES IN THE CONTEXT OF THIS \$15,000 GRANT.