

Université de Montréal

Caractérisation des mécanismes moléculaires et virologiques contribuant à la persistance du VIH-1 chez les individus sous thérapie antirétrovirale

Par Marion Pardons

Département de Microbiologie, Infectiologie et Immunologie
Faculté de Médecine
Université de Montréal

Thèse présentée en vue de l'obtention du grade de Philosophiae Doctor
(Ph.D.) en Microbiologie et Immunologie

Juillet 2019

© Marion Pardons, 2019

Membres du jury :

Directeur de recherche : Dr. Nicolas Chomont

Présidente-rapportrice : Dr. Marie-Claude Bourgeois Daigneault

Membre du jury : Dr. Nicole Bernard

Examineur externe : Dr. Andrew Mouland

Représentante du doyen : Dr. Naglaa Shoukry

Résumé et mots-clés

Avec près de 35 millions de personnes infectées à travers le monde et 60.000 au Canada, le VIH reste un problème majeur de santé publique. Bien que la thérapie antirétrovirale ait amélioré de façon considérable la qualité et la durée de vie des personnes infectées, elle ne permet pas d'éliminer complètement le virus de l'organisme. Cette persistance virale est liée à l'existence de réservoirs cellulaires et anatomiques dans lesquels le virus persiste par réplication résiduelle et/ou par latence, et au sein desquels le virus est invisible par le système immunitaire et insensible au traitement. La mise au point de nouvelles stratégies thérapeutiques visant à éliminer ces réservoirs viraux nécessite une compréhension approfondie de la nature des cellules dans lesquelles le virus persiste et des mécanismes moléculaires et virologiques associés à la persistance virale.

Bien que le virus persiste essentiellement dans les lymphocytes T CD4+ mémoires, le phénotype exact des cellules réservoirs reste à déterminer. Nous avons mis au point une nouvelle méthode de cytométrie en flux (HIV-Flow) permettant la détection des cellules produisant la protéine virale p24 et facilitant l'étude du phénotype des cellules réservoirs. Nos résultats suggèrent que le réservoir viral est constitué d'un ensemble hétérogène de sous-populations cellulaires exprimant divers marqueurs qui ne sont pas spécifiques aux cellules infectées de manière latente. Néanmoins, nous avons identifié certains marqueurs exprimés de façon préférentielle à la surface des cellules p24+, tels que PD-1, TIGIT et l'intégrine $\alpha 4\beta 1$. L'identification d' $\alpha 4\beta 1$ comme marqueur de réservoir viral ouvre la voie à de nouvelles perspectives thérapeutiques. Enfin, nos résultats montrent que les virus compétents pour la traduction protéique persistent dans les 3 sous-populations de lymphocytes T CD4+ mémoires [lymphocytes T CD4+ mémoires centraux (T_{CM}), transitionnels (T_{TM}), et effecteurs (T_{EM})], mais sont particulièrement enrichis dans les cellules T_{TM} et T_{EM} chez les individus sous ART.

Les 3 sous-populations de lymphocytes T CD4+ mémoires dans lesquelles le virus persiste possèdent des propriétés différentes en termes de capacité de survie et de prolifération. La mise au point de protocoles de cytométrie en flux permettant d'étudier divers facteurs impliqués dans l'expression transcriptionnelle du génome proviral (acétylation des histones, NF- κ B, PTEF-b) a révélé que ces facteurs sont exprimés à différents niveaux entre les sous-populations, d'où l'importance de tenir compte de l'hétérogénéité des réservoirs viraux. Nous avons également montré que les agents anti-latence ont des capacités différentes à moduler les niveaux de ces facteurs entre les différentes sous-populations. Enfin, grâce au HIV-Flow, nous avons identifié une combinaison d'agents anti-latence capable de réactiver très efficacement le virus dans les

T_{CM}. Des travaux supplémentaires devraient nous permettre de mettre en évidence une combinaison capable de réactiver le virus très efficacement dans toutes les sous-populations.

Au-delà des réservoirs cellulaires décrits ci-dessus, le VIH persiste dans une variété de sanctuaires anatomiques. Puisque les ganglions lymphatiques constituent un site de prédilection pour la persistance du VIH, nous avons étudié les mécanismes virologiques de persistance virale dans ce compartiment anatomique. Nous avons montré que la fréquence de cellules T CD4 produisant des ARNs tat/rev spontanément est plus élevée dans les ganglions lymphatiques que dans le sang des mêmes individus. Néanmoins, nous n'avons pas pu observer de production virale active par HIV-Flow dans les ganglions lymphatiques de ces individus, probablement en raison du faible nombre de cellules CD4+ obtenus.

En conclusion, les observations réalisées dans le cadre de cette thèse nous aident à mieux comprendre le phénomène de persistance virale, qui constitue le principal obstacle à l'élimination du VIH. Ces résultats devraient aider au développement de stratégies thérapeutiques permettant la rémission des personnes infectées par le VIH.

Mots clés: VIH, SIDA, persistance, latence, réservoirs, rémission, éradication

Abstract and key words

With nearly 35 million people infected worldwide and 60,000 in Canada, HIV remains a major public health problem. Although antiretroviral therapy (ART) has significantly improved the quality of life and lifespan of HIV-infected people, it does not completely eliminate the virus from the human body. HIV persistence is attributed to the existence of cellular and anatomical reservoirs in which the virus persists through residual replication and/or latency, and in which the virus is invisible to the host immune system and to ART. The development of new therapeutic strategies aimed at eliminating these viral reservoirs requires a thorough understanding of the nature of the cells in which the virus persists and of the molecular and virologic mechanisms contributing to viral persistence.

Although the virus primarily persists in memory CD4⁺ T cells, the exact phenotype of the reservoir cells remains to be determined. The development of HIV-Flow, a flow cytometry-based assay allowing the detection of cells producing the viral protein p24, greatly facilitated the study of the reservoir cells' phenotype. Our results suggest that the viral reservoir consists of a heterogeneous pool of cell subsets expressing various markers that are not specifically expressed by latently infected cells. Nevertheless, we have identified several markers preferentially expressed on the surface of p24⁺ cells, including PD-1, TIGIT and the $\alpha 4\beta 1$ integrin. The identification of $\alpha 4\beta 1$ as a marker of viral reservoirs opens the way to new therapeutic perspectives. Finally, our results show that translation-competent viruses persist in the three subsets of memory CD4⁺ T lymphocytes [central (T_{CM}), transitional (T_{TM}), and effector (T_{EM}) memory lymphocytes], but are particularly enriched in T_{TM} and T_{EM} cells in ART-suppressed individuals.

The three subsets of memory CD4⁺ T cells in which the virus persists have different properties in terms of survival and proliferation. The development of flow cytometry protocols to study various factors involved in the transcriptional expression of the proviral genome (histone acetylation, NF- κ B, PTEF-b) revealed that these factors are expressed at different levels between subsets. This observation highlights the importance of taking into account the heterogeneity of viral reservoirs. We have shown that latency reversing agents have different abilities to modulate the levels of these factors between the different subsets. Finally, by using the HIV-Flow assay, we identified a combination of latency reversing agents that is highly effective to reactivate the virus in T_{CM} cells. Further work should permit the identification of a combination that is capable of reactivating the virus very effectively in all subsets.

Beyond the cellular reservoirs described above, HIV persists in a variety of anatomical sanctuaries. Since lymph nodes are a major site for HIV persistence, we studied the virologic

mechanisms of viral persistence in this anatomical compartment. We showed that the frequency of cells producing tat/rev spontaneously is significantly higher in the lymph nodes compared to the blood. Nevertheless, we could not observe active viral production by HIV-Flow in the lymph nodes of these ART-suppressed individuals, probably due to the low number of CD4+ cells analyzed.

In conclusion, the observations made in this thesis contribute to a better understanding of the phenomenon of viral persistence, which is the main obstacle to HIV eradication. These results should favor the development of new therapeutic strategies allowing the remission of HIV-infected people.

Key words: HIV, AIDS, persistence, latency, reservoirs, remission, eradication

Table des matières

RÉSUMÉ ET MOTS-CLÉS	I
ABSTRACT AND KEY WORDS	III
TABLE DES MATIÈRES	V
LISTE DES TABLEAUX	VII
LISTE DES FIGURES	VIII
LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS	XI
REMERCIEMENTS	XV
CHAPITRE 1 : INTRODUCTION	1
1. VIRUS DE L'IMMUNODÉFICIENCE HUMAINE DE TYPE 1 (VIH-1) ET SYNDROME DE L'IMMUNODÉFICIENCE ACQUISE (SIDA).....	1
1.1. <i>Problématique</i>	1
1.2. <i>Classification</i>	1
1.3. <i>Modes de transmission</i>	2
1.4. <i>Organisation structurelle et génomique</i>	3
1.5. <i>Cycle répliatif du virus</i>	6
1.6. <i>Pathogénèse du VIH</i>	10
2. FACTEURS DE RESTRICTION ET DE DÉPENDANCE DU VIH-1.....	13
2.1. <i>Les facteurs de restriction</i>	13
2.2. <i>Les facteurs de dépendance</i>	15
3. LA THÉRAPIE ANTIRÉTROVIRALE.....	16
4. PERSISTANCE VIRALE.....	18
4.1. <i>Réservoirs anatomiques et cellulaires</i>	18
4.2. <i>Sous-populations de lymphocytes T CD4+ mémoires servant de réservoirs</i>	26
4.3. <i>Mécanismes de persistance virale</i>	28
4.4. <i>Latence pré-intégrationnelle et post-intégrationnelle</i>	31
4.5. <i>Mécanismes moléculaires de la latence post-intégrationnelle</i>	32
5. STRATÉGIES THÉRAPEUTIQUES CIBLANT LES RÉSERVOIRS VIRAUX.....	37
5.1. <i>Guérison stérilisante</i>	38
5.2. <i>Guérison fonctionnelle ou rémission</i>	39
6. MÉTHODES DE MESURE DE LA TAILLE DES RÉSERVOIRS VIRAUX.....	48
7. PHÉNOTYPER LES CELLULES RÉSERVOIRS.....	52
OBJECTIFS DE LA THÈSE	55
CHAPITRE 2 : CARACTÉRISATION ET QUANTIFICATION DES RÉSERVOIRS VIRAUX COMPÉTENTS POUR LA TRADUCTION CHEZ DES INDIVIDUS INFECTÉS TRAITÉS OU NON À L'ÉCHELLE DE LA CELLULE INDIVIDUELLE	57
ABSTRACT	60
AUTHOR SUMMARY	60
INTRODUCTION	61
RESULTS	63
DISCUSSION	69
MATERIALS AND METHODS	73
REFERENCES	78

CHAPITRE 3 : LES AGENTS ANTI-LATENCE INDUISENT DES RÉPONSES DIFFÉRENTES DANS DES RÉSERVOIRS CELLULAIRES DISTINCTS	111
SUMMARY	114
INTRODUCTION	115
RESULTS	117
DISCUSSION	122
MATERIAL AND METHODS	127
REFERENCES	132
CHAPITRE 4 : LA MAJORITÉ DES CELLULES T CD4 INFECTÉES PAR LE VIH DANS LES GANGLIONS LYMPHATIQUES DES INDIVIDUS SOUS ART PRODUISENT SPONTANÉMENT DES ARN VIRAUX.....	153
ABSTRACT	156
INTRODUCTION	157
RESULTS	159
DISCUSSION	162
MATERIAL AND METHODS	166
REFERENCES	169
CHAPITRE 5 : DISCUSSION ET PERSPECTIVES	181
CONCLUSION GÉNÉRALE.....	199
ANNEXE 1	XVII
BIBLIOGRAPHIE	XIX

Liste des tableaux

Chapitre 1 (Introduction)

Tableau 1.1. Les 4 classes de protéines encodées par les 9 gènes du VIH-1.....	p5
Tableau 1.2. Agents antirétroviraux approuvés par la FDA.....	p17
Tableau 1.3. Tentatives d'élimination des réservoirs viraux par transplantation de cellules souches hématopoïétiques CCR5delta32.....	p38

Chapitre 2 (Article 1)

Table 1: Characteristics of viremic individuals.....	p93
Table 2: Characteristics of ART-suppressed individuals.....	p94
Table S1: Frequencies of infected cells measured by different assays in samples from ART-suppressed individuals.....	p108
Table S2: Panels of antibodies used for phenotyping of p24+ cells.....	p109
Table S3: Median fold differences in the frequencies of p24+ cells and all cells expressing a given cellular marker.....	p110

Chapitre 3 (Article 2)

Table 1: Characteristics of study participants.....	p145
Table S1: Antibodies to cell surface markers.....	p150
Table S2: Sequences of the oligonucleotides used to quantify miRNA by real time PCR.....	p151

Chapitre 4 (Article 3)

Table 1: Characteristics of the participants.....	p177
--	------

Liste des figures

Chapitre 1 (Introduction)

Figure 1.1. Nombre de personnes infectées par le VIH en 2017 dans différentes régions du monde.....	p1
Figure 1.2. Particule virale mature du VIH-1.	p3
Figure 1.3. Génome du VIH-1 sous forme d'AN et d'ADN proviral.....	p4
Figure 1.4. Cycle réplcatif du VIH-1.....	p6
Figure 1.5. Étapes impliquées dans la rétro-transcription du génome viral.....	p8
Figure 1.6. Évolution de l'infection par le VIH chez un individu infecté non traité.....	p10
Figure 1.7. Le rôle des cellules dendritiques des muqueuses dans la réplication locale du VIH-1 et sa dissémination.....	p12
Figure 1.8. Évolution de la charge virale plasmatique avant, pendant, et après interruption de la thérapie antirétrovirale.....	p18
Figure 1.9. Sous-populations de lymphocytes T CD4+ mémoires et leur contribution au réservoir du VIH.....	p27
Figure 1.10. Mécanismes épigénétiques et non épigénétiques contribuant à la latence post-intégrationnelle du VIH-1.....	p32
Figure 1.11. Contrôle de l'expression génique via l'acétylation des histones.....	p34
Figure 1.12. Recrutement de HATs ou de HDACs au niveau du LTR5'.....	p35
Figure 1.13. Mécanisme d'action du complexe P-TEFb.....	p36
Figure 1.14. Temps de rémission et rebond viral dans le cadre de divers essais cliniques.....	p41
Figure 1.15. Stratégie du « <i>Shock and Kill</i> »	p47
Figure 1.16. Méthodes permettant de mesurer la taille des réservoirs viraux.....	p52

Chapitre 2 (Article 1)

Figures principales:	p87-92
-----------------------------------	--------

Figure 1. HIV-Flow allows the detection of p24-producing cells in samples from viremic and ART-suppressed individuals

Figure 2. Specificity, sensitivity and reproducibility of HIV-Flow.

Figure 3. HIV-Flow correlates with other assays measuring the size of the HIV reservoir.

Figure 4. p24-producing cells from untreated individuals are enriched in subsets expressing markers of activation and exhaustion.

Figure 5. p24-producing cells from untreated individuals are enriched in various cell subsets.

Figure 6. p24-producing cells from ART-suppressed individuals are enriched in TTM/TEM, PD-1+, TIGIT+ and $\alpha 4 + \beta 1$ + cells.

Figures supplémentaires :p95-107

Figure S1. Characterization of p24 KC57 and p24 28B7 antibodies.

Figure S2. MFI of p24 antibodies following stimulation.

Figure S3. Single positive cells contain low HIV DNA levels.

Figure S4. HIV DNA detection by PCR in p24+ single sorted cells.

Figure S5. Frequencies of p24+ cells in different subsets.

Figure S6. Boolean analysis

Figure S7. Contribution of different subsets to the pool of p24+ cells.

Figure S8. Frequencies of CD4 T cell subsets before and after stimulation with PMA/ionomycin.

Figure S9. Markers showing significant changes of expression following stimulation

Figure S10. p24+ cells from ART-suppressed individuals are not enriched in cells expressing high levels of CD32.

Figure S11. p24-producing cells from ART-suppressed individuals are highly enriched in CD45RA- $\alpha 4 + \beta 1$ +TIGIT+ cells.

Figure S12. Comparison of two permeabilization buffers for the detection of p24-producing cells by HIV-Flow.

Figure S13. Gating strategy used in HIV-Flow.

Chapitre 3 (Article 2)

Figures principales:.....p140-144

Figure 1. HDAC inhibitors display variable activities in subsets of memory CD4 T cells.

Figure 2. PKC agonists display variable activities in subsets of memory CD4 T cells.

Figure 3. PKC agonists are more potent at activating P-TEFb in differentiated subsets.

Figure 4. miR125b and miR155 are expressed at different levels in distinct memory subsets.

Figure 5. PKC agonists in combination with HDACi have enhanced capacity to reactivate HIV in TCM cells.

Figures supplémentaires :p146-149

Figure S1. Related to Figure 1. HDAC inhibitors display variable activities in subsets of memory CD4 T cells.

Figure S2. Related to Figure 1. HDACi uptake is not significantly different between subsets of memory CD4 T cells.

Figure S3. Related to Figure 5. Memory phenotype of CD4 T cells after stimulation with LRAs.

Figure S4. Related to Figure 5. PKC agonists in combination with HDACi have enhanced capacity to reactivate HIV in TCM cells.

Chapitre 4 (Article 3)

Figures principales:.....p173-176

Figure 1. Levels of active transcription are higher in lymph nodes than in blood in virally suppressed individuals.

Figure 2. PD-1 negative cells are the major contributor to the pool of cells with inducible RNA in lymph nodes from long-term suppressed individuals.

Figure 3. Phenotypic differences between short and long-term suppressed individuals in the blood and lymph nodes.

Figure 4. Tfh cells are rare in long-term suppressed individuals.

Figures supplémentaires :p178-180

Figure S1. Levels of active transcription are higher in the lymph nodes than in blood in virally suppressed individuals.

Figure S2. Productively infected cells are not detected in the lymph nodes from virally suppressed individuals.

Figure S3. PD-1 negative cells are the major contributors to the pool of cells with integrated HIV DNA in lymph nodes from long-term suppressed individuals.

Liste des sigles et abréviations

Abréviation	Anglais	Français
ADN	Desoxyribonucleic acid	Acide désoxyribonucléique
Akt/PKB	Protein kinase B	Protéine Kinase B
ALCAM	Activated leukocyte cell adhesion molecule	Molécule d'adhérence de leucocytes activés
AP-1	Activator protein 1	Protéine activatrice 1
APOBEC3	Apolipoprotein b mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like	Enzyme d'édition de l'ARNm de l'apolipoprotéine B
ARN	Ribonucleic acid	Acide ribonucléique
ARNt	Transfer RNA	ARN de transfert
ART	Antiretroviral therapy	Thérapie antirétrovirale
ATP	Adenosine triphosphate	Adénosine triphosphate
AZT	Azidothymidine (zidovudine)	Azidothymidine (Zidovudine)
BACH2	BTB domain and CNC homolog 2	BTB Domaine et CNC Homologue 2
Bcl2	B-cell lymphoma 2	Lymphome de cellules B type 2
Bcl6	B-cell lymphoma 6	Lymphome de cellules B type 6
BFA	Brefeldin a	Bréfeldine A
Bfl1 (BCL2A1)	Bcl-2 related protein A1	Protéine A1 de la famille Bcl-2
bNab	Broadly neutralizing antibody	Anticorps neutralisant à large spectre
BST-2	Bone marrow stromal cell antigen 2	Antigène cellulaire stromal de la moelle osseuse 2
CA	Capsid	Capside
ca-RNA	Cell-associated RNA	ARN associé aux cellules
CAR	Chimeric antigen receptor	Récepteur antigénique chimérique
Cas9	CRISPR-associated protein nuclease-9	Protéine nucléase 9 associée à CRISPR
CCR(n)	C-C motif chemokine receptor type (n)	Récepteur aux chimiokines C-C de type (n)
CDK9	Cyclin dependant kinase 9	Kinase 9 dépendante de la cycline
cf-RNA	Cell free-rna	ARN non associé aux cellules
CMV	Cytomegalovirus	Cytomégalovirus
CRF	Circulating recombinant form	Forme recombinante circulante
CRISPR	Clustered regularly interspaced short palindromic repeats	Répétitions palindromiques groupées et régulièrement espacées
CTIP-2	COUP-TF interacting protein 2	Protéine interagissant avec le facteur de transcription Coup 2
CTLA-4	Cytotoxic t-lymphocyte-associated protein 4	Protéine associée aux lymphocytes T cytotoxiques 4
CXCR(n)	C-X-C motif chemokine receptor type (n)	Récepteur aux chimiokines C-X-C de type (n)
dCA	Dydehydro-cortistatin a	Dydéhydro-cortistatine A
dNTP	Deoxynucleoside triphosphate	Deoxynucléoside triphosphate
DSIF	DRB sensitivity inducing factor	Facteur induisant la sensibilité au DRB
EBV	Epstein-barr virus	Virus Epstein-Barr
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay	Immunobuvardage
Env	Envelope	Enveloppe
FDA	US food and drug administration	Administration américaine des aliments et des médicaments

FLIPS	Full-length individual proviral sequencing assay	Essai visant à séquencer le génome proviral de taille complète
FNA	Fine needle aspiration	Aspiration avec une aiguille fine
Gag	Group antigen	Antigène de groupe
GALT	Gut-associated lymphoid tissue	Le tissu lymphoïde associé à l'intestin
gp	Glycoprotein	Glycoprotéine
HAART	Highly active antiretroviral therapy	Thérapie antirétrovirale hautement active
HAT	Histone acetyltransferase	Acétyltransférase des histones
HDAC	Histone deacetylase	Désacétylase des histones
HDACi	Histone deacetylase inhibitor	Inhibiteur de HDAC
HEXIM1/2	Hexamethylene bisacetamide-inducible protein	Protéine inductible par l'hexaméthylène bisacétamide
HLA	Human leukocyte antigen	Antigène de leucocyte humain
HMBA	Hexamethylene bisacetamide	Hexaméthylène bisacétamide
HPV	Human papillomavirus	Le virus du papillome humain
HSPC	Hematopoietic stem/progenitor cell	Cellules souches et progénitrices hématopoïétiques
HUSH	Human silencing hub	Complexe humain réprimant Hub
H _n K _n me ₁₋₂₋₃	Histone (n) lysine (n) mono/di/tri-methylation	Histone (n) lysine (n) mono/di/tri-méthylation
I-BET	Bromodomain and extraterminal bromodomain inhibitor	Inhibiteur de bromodomaines et de bromodomaines extraterminaux
IAP	Inhibitor of apoptosis protein	Protéine inhibitrice de l'apoptose
ICOS	Inducible T-cell costimulator	Costimulateur inductible
ICOSL	ICOS ligand	Ligand de ICOS
IFI16	Interferon gamma inducible protein 16	Protéine induite par l'interféron gamma 16
IFITM	Interferon-induced transmembrane protein	Protéine transmembranaire induite par l'interféron
IFN	Interferon	Interféron
IκB	Inhibitor of NF-κB	Inhibiteur de NF-κB
IL-(n)	Interleukin	Interleukine
ILC	Innate lymphoid cell	Cellule lymphoïde innée
IN	Integrase	Intégrase
IPDA	Intact proviral dna assay	Essai mesurant l'ADN intact proviral
Jak	Janus kinase	Kinase Janus
JC	John cunningham virus	Virus de John Cunningham
LAG-3	Lymphocyte activation gene 3	Gène d'activation lymphocytaire 3
LARP7	La-related protein 7	Protéine similaire aux protéines La 7
LEDGF	Lens epithelium-derived growth factor	Facteur de croissance dérivé de l'épithélium de la lentille
LPA	Latency promoting agent	Agent promouvant la latence
LRA	Latency reversing agent	Agent réactivateur de la latence
LTR	Long terminal repeat	Longue répétition terminale
M-CSF	Macrophage colony-stimulating factor	Facteur stimulant les macrophages
MA	Matrix	Matrice
MAdCAM	Mucosal addressin cell adhesion molecule	Molécule d'adhérence cellulaire d'adressine muosale

Mcl-1	Induced myeloid leukemia cell differentiation protein	Protéine de différenciation cellulaire induite par la leucémie myéloïde
MePCE	Methylphosphate capping enzyme	Enzyme méthylphosphate de la coiffe
MHC	Major histocompatibility complex	Complexe majeur d'histocompatibilité
MIP-Seq	Matched integration site and proviral sequencing	Séquencage simultané des sites d'intégration et du génome proviral
miRNA	Micro-RNA	Micro-ARN
MKL-2	Myocardin-like protein 2	Protéine similaire à la myocardine type 2
msRNA	Multiplispliced rna	ARN multi-épissé
mTOR	Mechanistic target of rapamycin	Cible mécanistique de la rapamycine
Mx2	Mx dynamin like GTPase 2	MX Dynamin Like GTPase 2
NC	Nucleocapsid	Nucléocapside
ncNF-kB	Non-canonical pathway of NF-kB	Voie non canonique de NF-kB
NELF	Negative elongation factor	Facteur négatif d'élongation
NF-AT	Nuclear factor of activated t-cells	Facteur nucléaire de cellules T activées
NF-kB	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated b cells	Facteur nucléaire activateur de la chaîne légère kappa de cellules B activées
NK	Natural killer	Cellule naturellement toxique
NNRTIs	Non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor	Inhibiteur non nucléosidique de la rétrotranscriptase
NRTIs	Nucleoside reverse transcriptase inhibitor	Inhibiteur nucléosidique de la rétrotranscriptase
nuc-1	Nucleosome-1	Nucléosome 1
pbs	Primer binding site	Site de liaison à l'amorce
ppt	Polypurine tract	Région polypurine
P-TEFb	Positive transcription elongation factor b	Facteur positif d'élongation de la transcription b
PCR	Polymerase chain reaction	Réaction de polymérase en chaîne
PD-1	Programmed cell death protein 1	Protéine de mort cellulaire programmée 1
PI	Protease inhibitor	Inhibiteur de protéase
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase	Kinase de phosphoinositide 3
PKC	Protéine kinase C	Protéine Kinase C
PMA	Phorbol 12-myristate 13-acetate	Phorbol 12-myristate 13-acetate
PML	Leukoencephalopathy	Leukoencéphalopathie
PR	Protease	Protéase
PTC	Post-treatment controller	Contrôleur post-traitement
QVOA	Quantitative viral outgrowth assay	Essai quantitatif de réplication virale
Rev	Regulator of expression of virion proteins	Régulateur de l'expression des protéines virales
RNase H	Ribonuclease H	Ribonucléase H
RT	Retrotranscriptase	Rétrotranscriptase
RUVBL1	Ruvb like AAA ATPase 1	RuvB Like AAA ATPase 1
SAMHD-1	SAM domain and HD domain-containing protein 1	Protéine contenant un domaine SAM et un domaine HD 1
SETDB1	Set domain bifurcated histone lysine methyltransferase 1	SET domaine bifurqué histone lysine méthyltransférase 1
SF3B1	Splicing factor 3B subunit 1	Sous-unité du facteur 3B d'épissage 1
SHIV	Simian-human immunodeficiency virus	Virus de l'immunodéficience humaine-simienne

shRNA	Small hairpin RNAs	Petit ARN en épingle à cheveux
SIDA	Acquired immunodeficiency syndrome	Syndrome de l'immunodéficience acquise
siRNA	Small interfering RNA	Petit ARN d'interférence
SIV	Simian immunodeficiency virus	Virus de l'immunodéficience simienne
SLC35B2	Solute carrier family 35 member B2	"Solute carrier" famille 35 membre B2
Smac	Second mitochondrial-derived activator of caspases	Activateur secondaire de caspases dérivé des mitochondries
snRNA	Small nuclear RNA	Petit ARN nucléaire
Sp1	Specificity protein 1	Protéine de spécificité 1
TALENS	Transcription activator-like effector nucleases	Nucléases effectrices de type activateur de transcription
TAR	HIV trans-activation response element	Élément de réponse du transactivateur de la transcription du VIH
Tat	Trans-activator of transcription	Transactivateur de la transcription
T _{CM}	Central memory T cell	Lymphocyte T central mémoire
TCR	T cell receptor	Récepteur de cellules T
T _{EM}	Effector memory T cell	Lymphocyte T effecteur mémoires
Tfh	Follicular helper T cell	Lymphocyte T folliculaire auxiliaire
TIGIT	T-cell immunoreceptor with Ig and ITIM domains	Immunorécepteur de cellules T contenant des domaines Ig et ITIM
TILDA	Tat/rev induced limiting dilution assay	Essai de dilutions limites quantifiant Tat/Rev
Tim3	T-cell immunoglobulin and mucin-domain containing-3	Immunoglobuline de cellules T contenant des domaines mucines 3
TLR	Toll like receptor	Récepteur de type Toll
T _N	Naive T cell	Lymphocyte T naïf
TNF	Tumor necrosis factor	Facteur de nécrose tumorale
TPST2	Tyrosylprotein sulfotransferase 2	Protéine Tyrosyl sulfotransferase 2
TRAIL	Tumor necrosis factor–related apoptosis-inducing ligand	Ligand induisant l'apoptose liée au facteur de nécrose tumorale
Treg	Regulatory T cell	Lymphocyte T régulateur
TRIM32	Tripartite motif-containing protein 32	Protéine contenant un motif tripartite 32
TRIM5alpha	Tripartite motif-containing protein 5	Protéine contenant un motif tripartite 5
T _{SCM}	Stem cell like memory T cell	Lymphocyte T souche mémoire
T _{TD}	Terminally differentiated T cell	Lymphocyte T terminalement différencié
T _{TM}	Transitional memory T cell	Lymphocyte T transitionnel mémoire
URF	Unique recombinant form	Forme recombinante unique
usRNA	Unspliced RNA	ARN non épissé
UTR	Untranslated region	Région non traduite
VCAM-1	Vascular cell adhesion protein 1	Protéine d'adhérence aux cellules vasculaires
Vif	Viral infectivity factor	Facteur d'infectivité virale
VIH	Human immunodeficiency virus	Virus de l'immunodéficience humaine
Vpr	Viral protein r	Protéine virale R
Vpu	Viral protein u	Protéine virale U
ZFN	Zinc finger nuclease	Nucléase à doigts de zinc

Remerciements

Il est impossible de terminer l'écriture de cette thèse sans remercier Nicolas, mon directeur de thèse. Nicolas, ce fut un immense honneur et plaisir d'être ta première étudiante au doctorat, de bénéficier de ton enseignement pendant ces 4 dernières années. Je me souviens encore de mes débuts dans le labo, et de l'enthousiasme débordant avec lequel je ressortais de ton bureau (dans lequel je passais beaucoup trop souvent) chaque fois que tu avais du temps pour discuter de sciences avec moi. Je tiens à te remercier du fond du cœur pour le temps, l'énergie (et il en fallait !), et le soutien constant que tu m'as accordés au cours de mon doctorat. Merci aussi de m'avoir permis de participer à des conférences de renom, pendant lesquelles j'ai eu la chance de présenter mes résultats de recherches et de discuter avec des scientifiques presque aussi passionnants et passionnés que toi.

Je tiens également à remercier Rémi, qui a eu la patience de me former, malgré mes tocs scientifiques et mon caractère bien trempé. Rémi, c'était un immense plaisir de t'avoir à mes côtés pendant ces 4 années, de partager ces discussions scientifiques qui m'ont permis d'évoluer tout au long de mon parcours scientifique. Merci pour ta disponibilité et tes conseils de grand sage. Ta bonne humeur et ton rire contagieux vont me manquer.

À mes collègues de travail et amis, c'était un immense bonheur de travailler dans une équipe aussi motivée, dynamique, et tellement créative. Grâce à vous je me suis déguisée en Dalton, en nain grincheux (on se demande pourquoi), en minion qui crie trop fort (c'est bizarre), et en lapin pressé. L'annuelle photo de Noël va me manquer, ohhh que oui ! Merci à vous tous d'avoir toléré (à moitié) mes millions de tubes qu'il fallait que je conserve à la fin de chaque manip pour ma conscience professionnelle. Aujourd'hui, je vous promets que je suis une personne (relativement) moins stressée, même si ça ne se voit pas :D.

Amélie, merci pour les nombreuses PCRs effectuées au cours de ces dernières années, mais surtout pour ton amitié dès ton arrivée dans le labo (à l'époque où il n'y avait encore que nous, tu te souviens ?). À Marta, la reine des QVOA et des TILDA, merci pour tes conseils judicieux tout au long de ce parcours sinueux (et pour tes guacamoles et tes mojitos de feu qui ont égayé tous les party de labo). À Isabelle, c'était du génie de t'avoir dans le labo, de partager mes petites histoires avec toi (et de m'écouter même quand tu voulais travailler !). À Caro et Pierre qui sont en train de poursuivre mon projet, j'ai extrêmement hâte de voir les belles données que vous allez générer avec le HIV-Flow ! Pierre, merci de m'avoir fait prendre conscience de ma

personnalité (même si je ne dors plus la nuit), grâce à toi je modère mon caractère persévérant et je travaille mon empathie. Caro, je compte sur toi pour maintenir le niveau sonore lorsque je serai partie (il se pourrait que ça soit un peu trop calme dans l'espace étudiants après mon départ). Julia, merci pour les longues discussions que nous avons partagées et d'avoir pris soin de mon petit cœur dans les moments difficiles.

Merci à tous les membres qui ont siégé sur mes comités de suivi et mon comité de pré-doctorat, pour leurs précieux conseils qui m'ont permis d'avancer sur mes projets : Dr. Petronela Ancuta, Dr. Guy Lemay, et Dr. Michel Tremblay. Merci également à tous les membres de mon jury de thèse qui ont accepté de relire ma thèse malgré les courts délais : Dr. Nicole Bernard, Dr. Andrew Moulard, Dr. Marie-Claude Bourgeois Daigneault, et Dr. Naglaa Shoukry.

Enfin, je tiens à remercier infiniment mes parents, qui ont suivi de près mes aventures scientifiques et humaines au pays du sirop d'érable et des caribous. Merci d'avoir parcouru des milliers de km chaque année pour connaître ma petite vie canadienne et la partager avec moi. Merci à vous deux de m'avoir rappelé à chaque jour à quel point vous étiez fiers de moi, et d'avoir ouvert une bouteille de champagne à chacun de mes petits succès scientifiques. C'était tellement rassurant de vous savoir si près, même quand vous étiez si loin.

Chapitre 1 : Introduction

1. Virus de l'immunodéficience humaine de type 1 (VIH-1) et syndrome de l'immunodéficience acquise (SIDA)

1.1. Problématique

Le virus de l'immunodéficience humaine de type 1 (VIH-1), agent pathogène responsable du syndrome de l'immunodéficience acquise (SIDA), reste un problème majeur de santé publique à travers le monde. En 2017, près de 37 millions de personnes vivaient avec le VIH, et 1,8 million de nouveaux cas d'infections ont été rapportés au cours de l'année (Figure 1.1) [1]. Parmi ces 37 millions de personnes infectées, seulement 22 millions d'individus avaient accès à la thérapie antirétrovirale, soulignant l'importance d'améliorer l'accès au traitement à travers le monde [1]. Près de 40 ans après la découverte du VIH-1, il n'existe toujours pas de vaccin prophylactique ni de traitement curatif.

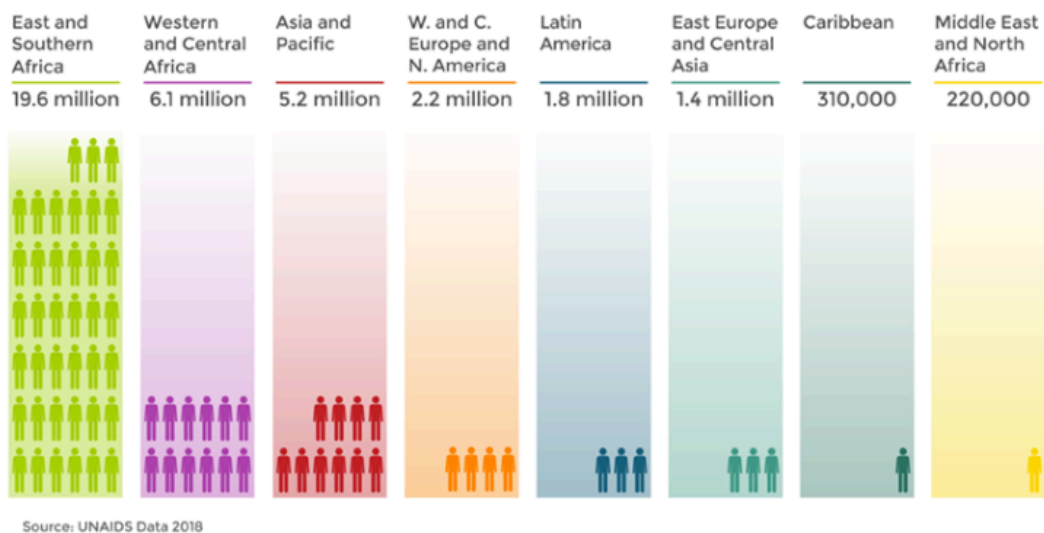


Figure 1.1. Nombre de personnes infectées par le VIH en 2017 dans différentes régions du monde.

En 2017, près de 37 millions de personnes étaient infectées par le VIH-1 à travers le monde. La vaste majorité des personnes infectées vivent dans des pays à faibles ou moyens revenus. *Issu de <https://www.avert.org/global-hiv-and-aids-statistics>*

1.2. Classification

Le VIH appartient à la famille des rétrovirus, et à la sous-famille des orthoretrovirinae. Il s'agit donc d'un virus enveloppé à ARN simple brin contenant une enzyme virale appelée la rétrotranscriptase, qui lui permet de convertir son génome ARN en ADN après son entrée dans la cellule. Il fait partie du genre Lentivirus, caractérisé par une réplication lente et l'existence d'une longue période d'incubation entre la primo-infection et l'apparition de symptômes.

Le VIH-1 présente une haute diversité génétique [2]. Les souches du VIH-1 peuvent être divisées en 4 groupes distincts : M (*Major*), O (*Outlier*), N (*Nonoutlier : non-M, non-O*), P (*Pending the identification of further human cases*). Le groupe M représente le groupe prédominant et est responsable de l'épidémie mondiale du VIH. Le groupe O représente 5% des infections et circule principalement dans les pays de l'Afrique centrale et de l'ouest, tandis que les groupes N et P sont rares et principalement observés au Cameroun. Le groupe M peut être sous divisé en 9 sous-types génétiquement distincts : A, B, C, D, F, G, H, J and K. De plus, il existe également des formes recombinantes uniques (URFs) ou circulantes (CRFs). Ces formes proviennent de la recombinaison de plusieurs sous-types chez un individu infecté par plusieurs sous-types viraux. Si ces virus recombinants sont identifiés chez plus de 3 personnes, ils sont considérés comme circulants (CRFs) ; dans le cas contraire ils sont considérés comme uniques (URFs). Le sous-type B est présent dans 12% des cas d'infection à l'échelle mondiale, et est le sous-type dominant en Amérique, en Europe de l'Ouest et en Australie. Il est à noter que la majorité des recherches cliniques ont été effectuées sur le sous-type B. Le sous-type C représente environ 50% des cas d'infection dans le monde et circule principalement en Afrique du sud et de l'est, ainsi qu'en Inde.

1.3. Modes de transmission

Il existe 4 modes de transmission principaux du VIH-1 : 1) Les rapports sexuels non protégés, 2) Les transfusions sanguines, 3) Le partage de matériel utilisé pour l'injection intraveineuse de drogues, et 4) La transmission verticale de la mère à l'enfant pendant la grossesse (*in utero*), à la naissance (*post-partum*) ou durant l'allaitement [3]. La transmission sexuelle est le principal mode de transmission dans la majorité des pays. En 2009, la transmission hétérosexuelle était responsable d'environ 70% des cas d'infection à travers le monde [3]. Au Canada, en 2008, environ 44% des nouvelles infections étaient attribuées aux relations homosexuelles entre les hommes, et 36% aux relations hétérosexuelles (*données publiées par l'agence de santé publique du Canada*). Aux États-Unis, en 2014, les rapports homosexuels entre les hommes étaient responsables de 67% des nouveaux cas d'infection (*données publiées par le centre de contrôle et prévention des maladies*). Il existe un plus grand risque de transmission du VIH lors d'un rapport anal que d'un rapport vaginal (environ 18 fois plus élevé) [4], expliquant pourquoi les hommes ayant des relations sexuelles avec les hommes sont généralement plus affectés. En effet, comparativement à la muqueuse vaginale, la muqueuse anale est plus susceptible aux dommages tissulaires et contient de très grands nombres de cellules lymphocytaires qui sont les principales cibles de l'infection par le VIH [5].

1.4. Organisation structurelle et génomique

Le VIH-1 est un virus enveloppé d'un diamètre moyen de 100nm (Figure 1.2) [6]. L'enveloppe virale dérive de la bicouche lipidique de la cellule hôte, et contient des trimères d'une protéine d'enveloppe virale gp160. La matrice constitue une couche intermédiaire entre l'enveloppe et la capsid, et est formée de la protéine p17 (MA : matrice). La capsid, quant à elle, est de forme conique et est formée d'environ 2000 copies de la protéine de capsid p24 (CA : capsid). Cette capsid renferme les enzymes du cycle réplcatif [rétrotranscriptase (RT), protéase (PR), intégrase (IN)] ainsi que deux molécules identiques d'acide ribonucléique (ARN) monocaténaire de polarité positive. Le complexe nucléocapsid consiste en l'association du matériel génétique viral avec la protéine virale p7 (NC : nucléocapsid).

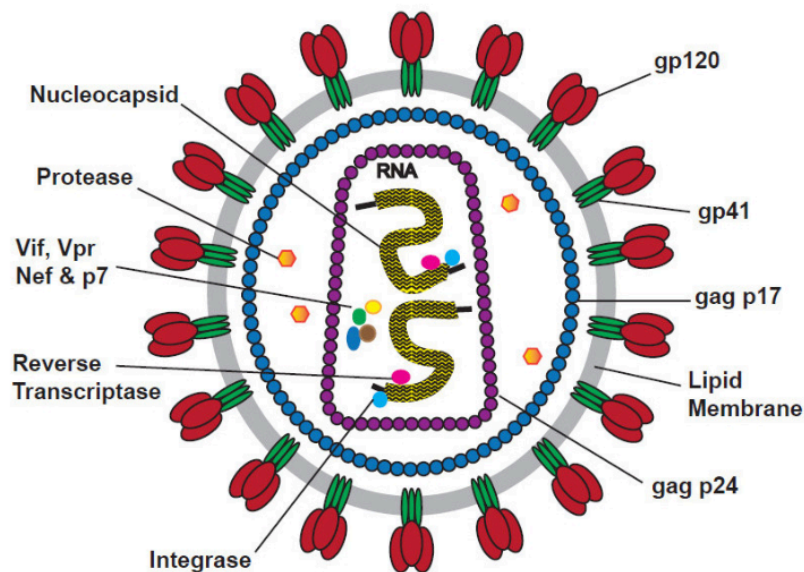


Figure 1.2. Particule virale mature du VIH-1. La particule virale du VIH-1 est formée d'une bicouche lipidique contenant des trimères de la protéine d'enveloppe (gp160), d'une matrice formée de la protéine p17, et d'une capsid formée de la protéine p24. La capsid renferme les enzymes du cycle réplcatif ainsi que le matériel génétique du virus.

Issu de <https://www.eenzyme.com/hivresearchtools.aspx>

Le génome du VIH-1 est formé de deux molécules identiques d'ARN monocaténaire de polarité positive (5'→3'), appariées de manière non covalente. Tout comme les ARNm cellulaires, l'ARN viral possède une coiffe en 5' et une queue polyadénylée en 3'. À chaque extrémité du génome ARN se trouve une région non codante, formée d'une petite séquence répétée R juxtapuée à la séquence U5 du côté 5' et à la séquence U3 du côté 3' [7] (Figure 1.3).

Sous forme d'acide désoxyribonucléique (ADN) proviral, qui correspond à la forme obtenue après rétro-transcription, le génome du VIH-1 possède à chacune de ses extrémités des séquences répétitives portant le nom de « *Long Terminal Repeats* » (LTRs), obtenues par duplication de la séquence U3 du côté 5' et de la séquence U5 du côté 3' (Figure 1.3). Les neuf gènes du VIH (*gag*, *pol*, *env*, *vif*, *vpr*, *vpu*, *tat*, *rev*, *nef*) sont localisés entre le LTR 5' et le LTR 3' et codent pour 15 protéines qui peuvent être divisées en 4 classes : les protéines de structure qui dérivent du gène *gag* (MA, CA, NC, p6) et du gène *env* (gp120, gp41), les enzymes virales qui dérivent du gène *pol* (PR, RT, IN), les protéines de régulation (Tat, Rev), et les protéines accessoires (Vif, Vpr, Vpu, Nef) [8]. Les fonctions de ces protéines sont reprises dans le tableau 1.1.

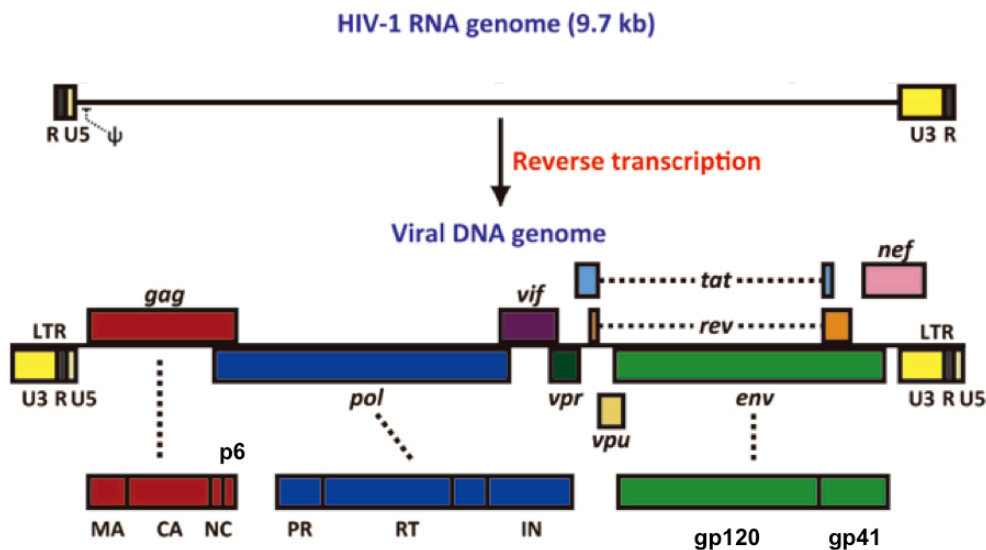


Figure 1.3. Génome du VIH-1 sous forme d'ARN et d'ADN proviral. Le génome du VIH-1 a une longueur d'environ 9kb, et est formé de 9 gènes codant pour des protéines structurales, des enzymes virales, des protéines de régulation, et des protéines accessoires. *Issu de <https://www.intechopen.com/books/viral-gene-therapy/gene-regulatable-lentiviral-vector-system>*

Tableau 1.1. Les 4 classes de protéines encodées par les 9 gènes du VIH-1

Classe de protéines	Gène	Produits protéiques	Fonction	
Protéines de structure	<i>gag</i>	MA (p17)	Protéine de matrice	
		CA (p24)	Polyprotéine p55	Protéine de capside
		NC (p7)		Protéine associée au matériel génétique viral
		p6	Contient des sites d'ancrage pour Vpr	
	<i>env</i>	gp120	Polyprotéine gp160	Interaction avec le complexe récepteur/co-récepteur
		gp41		Fusion entre l'enveloppe virale et la bicouche de la cellule hôte
Enzymes virales	<i>pol</i>	Rétro-transcriptase (RT)	Catalyse la conversion de l'ARN viral en une copie ADN double brin	
		Intégrase (IN)	Catalyse l'intégration de l'ADN viral dans le génome de la cellule hôte	
		Protéase (PR)	Permet la conversion des particules virales immatures en particules virales infectieuses via la maturation des protéines virales par protéolyse	
Protéines de régulation	<i>tat</i>	Tat (trans-activator of transcription)	Transactivateur transcriptionnel (régulation transcriptionnelle)	
	<i>rev</i>	Rev (regulator of virion expression)	Facilite l'export des ARNm non épissés et simplement épissés vers le cytoplasme	
Protéines accessoires	<i>nef</i>	Nef (Negative effector)	Régulation négative de l'expression du CD4 et des molécules MHC de classe I à la surface des cellules infectées	
	<i>vpr</i>	Vpr (Viral protein r)	Favorise le transport actif du complexe de pré-intégration dans le noyau Arrête le cycle cellulaire en phase G2	
	<i>vpu</i>	Vpu (Viral protein u)	Régulation négative de l'expression du CD4 et de HLA-C Neutralise le facteur de restriction BST-2 => Favorise le relargage des virions à la surface des cellules infectées.	
	<i>vif</i>	Vif (Viral infectivity factor)	Favorise l'incorporation de la glycoprotéine d'enveloppe au sein des particules virales. Neutralise les facteurs de restriction APOBEC => Augmente l'efficacité de la synthèse de l'ADN viral.	

1.5. Cycle réplcatif du virus

Le cycle de réplication du VIH-1 se caractérise par la succession de plusieurs étapes: l'entrée du virus dans la cellule hôte, la rétro-transcription du génome viral, l'intégration du génome viral dans l'ADN de la cellule hôte, la transcription du génome viral et la traduction des protéines virales, et pour terminer l'assemblage, le bourgeonnement et la maturation des particules virales (Figure 1.4).

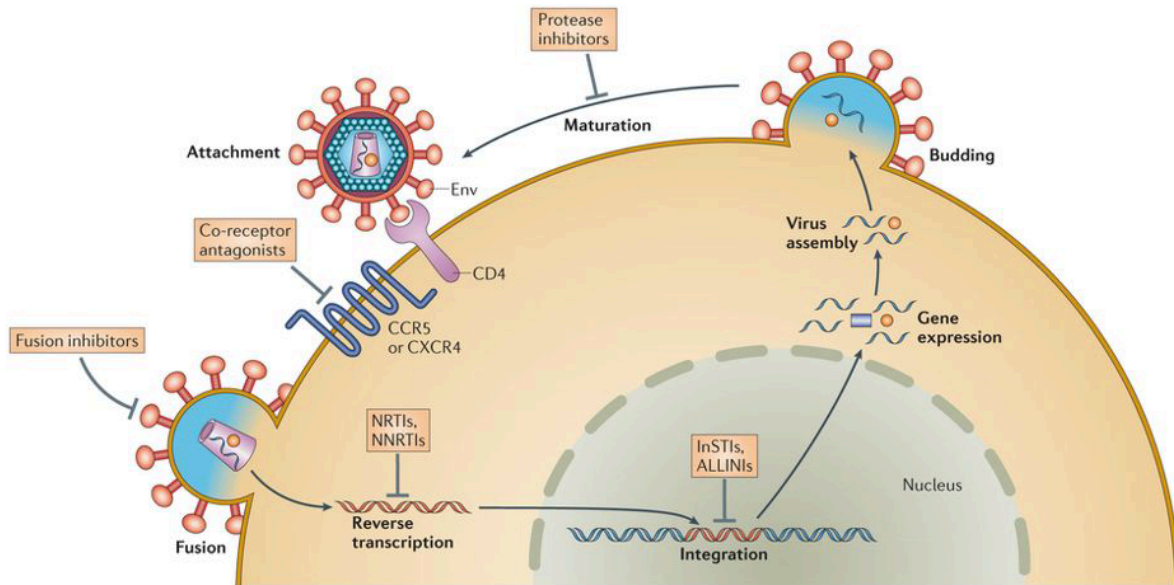


Figure 1.4. Cycle réplcatif du VIH-1. Le cycle réplcatif du VIH-1 se caractérise par plusieurs étapes successives : l'entrée du virus dans la cellule hôte (fusion), la rétro-transcription du génome viral, l'intégration du génome viral dans l'ADN de la cellule hôte, la transcription du génome viral et la traduction des protéines virales, et l'assemblage/bourgeonnement/maturation des particules virales. Chacune de ces étapes peut être ciblée par divers agents antirétroviraux pour inhiber la réplication virale. *Issu de (Laskey SB and Siliciano RF, Nature Reviews Microbiology, 2014)*

L'entrée du virus dans la cellule hôte implique l'interaction entre la sous-unité gp120 de la protéine d'enveloppe virale et le récepteur CD4, principalement retrouvé à la surface des lymphocytes T CD4+. Cette interaction résulte en une série de changements conformationnels qui permettent à la protéine gp120 de se lier au co-récepteur CCR5 ou CXCR4 [9]. Les isolats viraux peuvent présenter des tropismes différents : ils peuvent soit se lier au co-récepteur CCR5 uniquement (virus R5), soit au co-récepteur CXCR4 uniquement (virus X4), ou aux deux co-récepteurs (virus R5X4). Dans les premiers stades de l'infection, le virus utilise préférentiellement le co-récepteur CCR5 [10], ce qui permet l'infection des cellules T CD4+ activées, les macrophages et les cellules dendritiques [11]. Néanmoins, chez environ 20-50% des individus infectés, le tropisme évolue de R5 vers X4 dans les stades tardifs de l'infection [12], permettant l'infection des cellules T CD4+ naïves qui expriment de hauts niveaux de CXCR4 mais de faibles

niveaux de CCR5 [13]. Cette modification du tropisme cellulaire est associée à une rapide déplétion du nombre de lymphocytes T CD4+ et une progression accélérée de la maladie. Il est à noter que les variants R5 persistent pendant toutes les étapes de l'infection par le VIH malgré l'apparition des variants X4 et R5X4. Par ailleurs, une adaptation de la glycoprotéine d'enveloppe est également observée au cours de l'infection, favorisant l'infection de cellules cibles exprimant de faibles niveaux de CD4, comme les macrophages [14 , 15].

L'interaction entre la protéine gp120 et le complexe récepteur/co-récepteur induit un changement conformationnel permettant l'activation de la sous-unité transmembranaire gp41 de la protéine d'enveloppe virale. Une fois activée, gp41 favorise la fusion entre l'enveloppe virale et la bicouche lipidique de la cellule hôte [16], ce qui permet la libération de la nucléocapside dans le cytoplasme de la cellule hôte. De plus, la liaison de gp120 au complexe récepteur/corécepteur joue non seulement un rôle dans l'entrée, mais entraîne également l'activation de nombreuses voies de signalisation intracellulaires impliquées dans le chimiotactisme, la survie cellulaire et le réarrangement du cytosquelette [17]. L'implication de ces voies de signalisation dans la pathogénèse du VIH reste controversée. Néanmoins, il a été montré que l'interaction entre la gp120 et le co-récepteur CXCR4 favoriserait l'infection des cellules T CD4+ au repos en induisant l'activation de la cofiline, une molécule de dépolymérisation de l'actine jouant un rôle critique dans la remodelisation du cytosquelette et la migration nucléaire du virus [18].

La rétro-transcription est une étape indispensable dans le cycle de réplication des rétrovirus [19]. Cette étape est catalysée par la rétrotranscriptase (ou transcriptase inverse ; RT) virale, qui est encodée par le gène *pol*, et permet la conversion de l'ARN viral en une copie ADN double brin. La rétro-transcription implique plusieurs étapes successives (Figure 1.5) [20]. Dans un premier temps, un ARN de transfert de la cellule hôte (ARNt) se lie à une séquence complémentaire (*pbs* : *primer binding site*) présente dans l'ARN viral et située à proximité de l'extrémité 5'. La synthèse de l'ADN viral entraîne la formation d'un complexe ARN/ADN. La RT virale possède également une activité de RNase H, qui lui permet de dégrader l'ARN viral au sein de ce complexe ARN/ADN. Le brin ADN nouvellement synthétisé (brin sens) est ensuite transféré à l'extrémité 3' du génome viral ARN, et la synthèse du brin sens peut dès lors se poursuivre. En parallèle, l'ARN viral est dégradé par la RNase H, à l'exception de la région ppt (*polypurine tract*) qui est résistante à la dégradation. Cette région ppt sert d'amorce pour la synthèse de l'autre brin d'ADN viral (brin anti-sens). Le brin anti-sens nouvellement synthétisé est ensuite transféré, ce qui permet de compléter la synthèse des deux brins d'ADN viral. A la fin de cette étape de rétro-transcription, l'ADN viral reste lié à des protéines cellulaires et virales pour former le complexe de pré-intégration, qui est activement transporté vers le noyau.

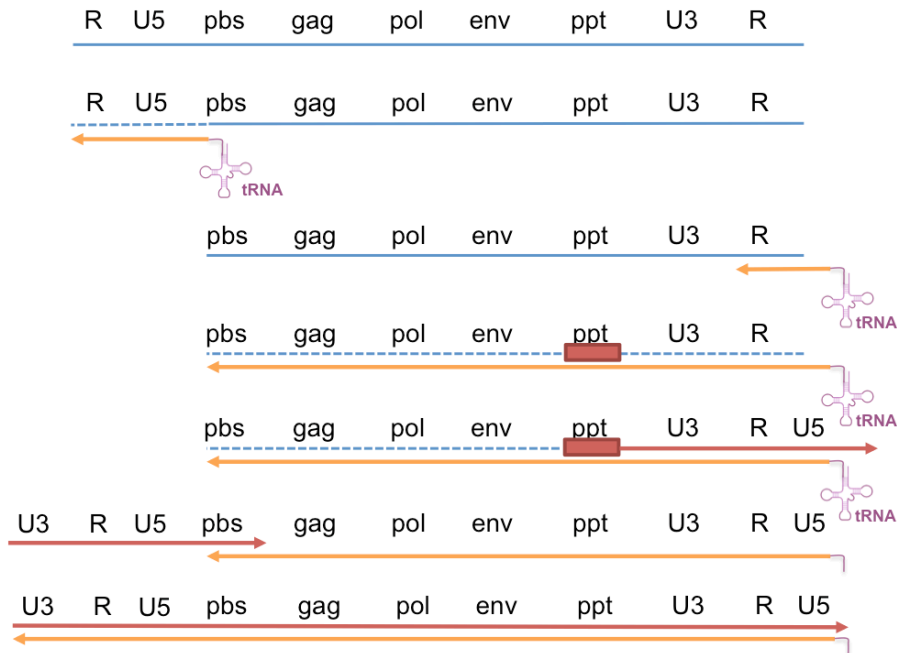


Figure 1.5. Étapes impliquées dans la rétro-transcription du génome viral. La liaison d'un ARNt de la cellule hôte à sa séquence complémentaire (pbs : primer binding site) dans l'ARN viral (en bleu) permet d'initier la synthèse du brin ADN sens (en orange). La RNase H dégrade l'ARN viral au sein du complexe ARN/ADN. Le brin ADN sens nouvellement synthétisé est transféré à l'extrémité 3' du génome viral ARN, et la synthèse du brin sens se poursuit. En parallèle, l'ARN viral est dégradé par la RNase H, à l'exception de la région ppt (*polypurine tract*). Cette région ppt sert d'amorce pour la synthèse du brin anti-sens (en rouge). Le transfert du brin anti-sens nouvellement synthétisé permet de compléter la synthèse des deux brins d'ADN viral.

L'intégration de l'ADN viral dans le génome de la cellule hôte est catalysée par l'intégrase virale, qui est amenée dans le noyau grâce au complexe de pré-intégration [21]. L'intégrase est composée de trois domaines structuraux distincts [22]. Le domaine N terminal contient un motif similaire à un doigt de zinc qui permet la liaison du Zn^{2+} . Le domaine C terminal permet de lier l'ADN, favorisant la stabilité du complexe intégrase/ADN. Enfin, le domaine central est responsable de l'activité catalytique de l'intégrase. En effet, la triade catalytique (Asp64, Asp116, Glu152) définit le site actif de l'intégrase et permet la liaison d'un cofacteur métallique cationique (Mg^{2+} ou Mn^{2+}) qui est absolument indispensable pour l'activité enzymatique de l'intégrase. L'intégration du génome viral dans le génome de la cellule hôte implique 2 étapes successives : le traitement de l'extrémité 3' (*3'-end processing*) et le transfert de brin [23]. La première étape consiste à éliminer deux nucléotides à chaque extrémité 3' de l'ADN viral double brin, tandis que la deuxième étape permet de lier de façon covalente les extrémités 3' du génome viral aux extrémités 5' de l'ADN cible. Bien qu'il existe de nombreux sites d'intégration dans le génome de la cellule hôte, ce phénomène d'intégration survient majoritairement dans des régions transcriptionnellement actives [24]. Le facteur cellulaire LEDGF/p75 (*Lens Epithelium-derived*

Growth factor) joue un rôle important dans l'efficacité du processus d'intégration et dans le mécanisme de ciblage du génome viral vers ces gènes transcriptionnellement actifs [25]. Suite à son intégration dans le génome de la cellule hôte, l'ADN proviral est transcrit grâce aux composantes de la machinerie cellulaire. La transcription du provirus est régulée par l'activité du promoteur du VIH, qui se trouve au niveau du LTR5'. Ce LTR contient toute une série de sites de liaison à des facteurs de transcription, tels que Sp1, NF-kB, AP-1 et NFAT. Plusieurs types de transcrits peuvent être produits à partir du génome proviral : des petits transcrits multi-épissés qui codent pour les protéines de régulation Tat et Rev ; des transcrits partiellement épissés qui codent pour les protéines Env, Vif, Vpr et Vpu ; et des transcrits non épissés qui servent d'une part de génome pour les nouvelles particules virales et d'autre part de matrice pour la synthèse de la polyprotéine p55 Gag [26]. Ces diverses protéines sont produites via différentes voies cellulaires. La synthèse de la polyprotéine p55 survient au niveau des ribosomes libres dans le cytoplasme, tandis que la protéine Env est synthétisée au niveau du réticulum endoplasmique sous forme de précurseur gp160. Cette glycoprotéine est ensuite clivée au niveau du Golgi par les enzymes cellulaires pour donner lieu aux glycoprotéines gp120 (surface) et gp41(transmembranaire)[27].

Le processus d'assemblage dépend de la polyprotéine p55, dérivée du gène *gag*. L'expression de cette protéine suffit pour permettre la génération de particules virales sphériques [28]. Le domaine amino-terminal MA de cette protéine permet son ciblage vers la membrane plasmique de la cellule hôte, au niveau de zones enrichies en protéines d'enveloppe. Le domaine central CA oligomérisé pour permettre la formation de la capsid. Le domaine NC est capable de lier le génome viral, ce qui permet l'empaquetage de ce dernier au sein des particules virales. Le domaine C-terminal p6, quant à lui, contient des sites d'ancrage pour la protéine accessoire Vpr ainsi que pour des protéines impliquées dans le processus de relargage de la particule virale à la surface de la cellule hôte. L'étape de bourgeonnement permet l'acquisition de l'enveloppe virale, qui dérive de la bicouche lipidique de la cellule hôte. A ce stade, les virions néo-synthétisés sont immatures. Au cours du bourgeonnement, la protéase virale est activée et la maturation des protéines par protéolyse permet la conversion des virions immatures en particules virales infectieuses [29].

Toutes les étapes du cycle de réplication peuvent être ciblées par des agents antirétroviraux pour inhiber la réplication virale (Figure 1.4). Cette thématique est abordée dans le point 3.

1.6. Pathogénèse du VIH

L'évolution de l'infection par VIH-1 se caractérise par l'existence de 3 stades successifs : le stade de primo-infection, le stade d'infection chronique et le stade SIDA (Figure 1.6) [30-32].

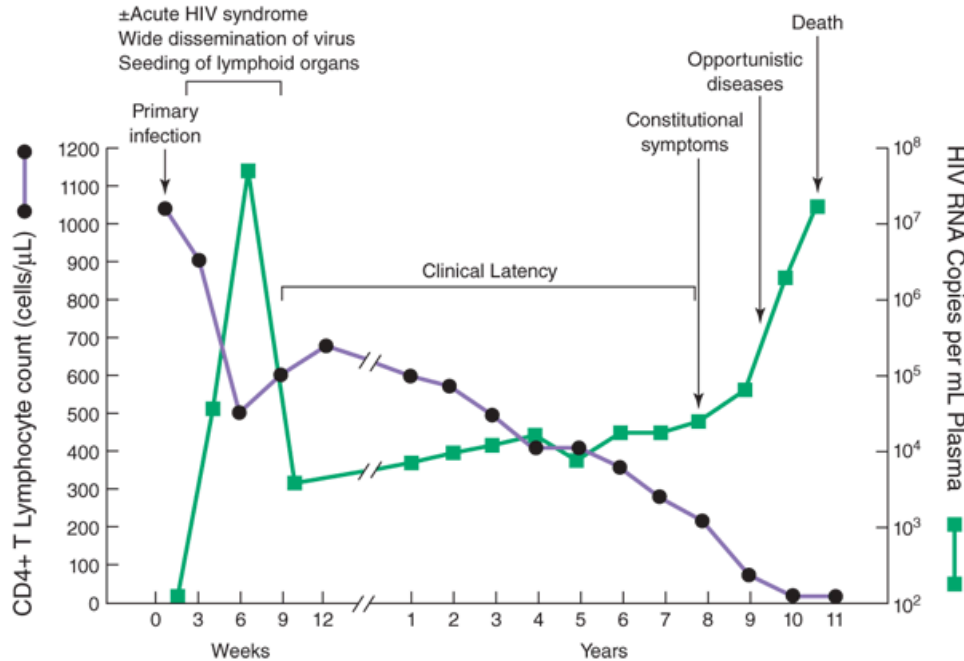


Figure 1.6. Évolution de l'infection par le VIH chez un individu infecté non traité. La phase de primo-infection se caractérise par une augmentation de la charge virale plasmatique et une diminution progressive du nombre de lymphocytes T CD4+ dans le sang. Suite à la mise en place d'une réponse immunitaire adaptative, le taux de lymphocytes T CD4+ circulants remonte progressivement, tandis que la charge virale plasmatique diminue fortement. La phase d'infection chronique se caractérise par une réduction linéaire du taux de lymphocytes T CD4+. La phase SIDA débute lorsque le taux de lymphocytes T CD4+ devient inférieur à 200 cellules/μL, et va de pair avec une évolution accélérée de la maladie, une rapide augmentation de la charge virale et un rapide déclin du taux de lymphocytes T CD4+. L'épuisement du système immunitaire résulte en une susceptibilité accrue vis-à-vis des infections opportunistes, aboutissant à la mort des individus infectés. Issu de (Pantaleo G et al, *New England Journal of Medicine*, 1993).

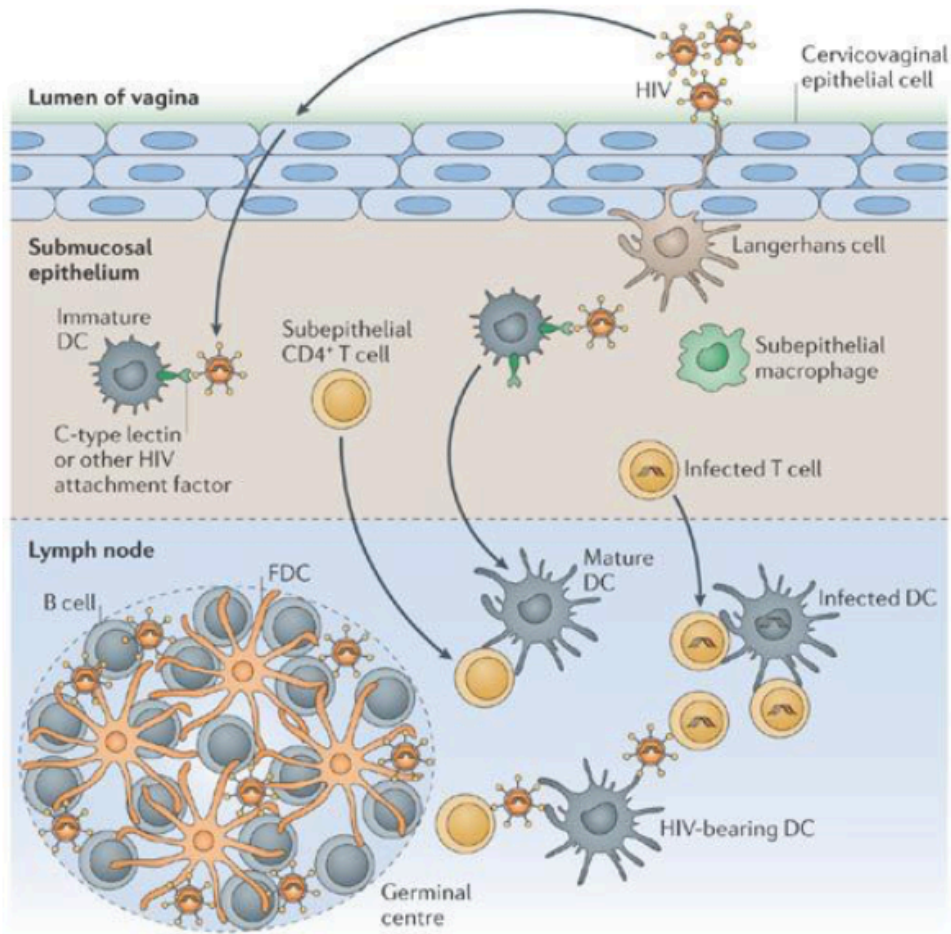
Infection aiguë ou primo-infection

Suite à la transmission, le virus infecte dans un premier temps les cellules T des muqueuses, ce qui lui permet de se répliquer localement. Les cellules dendritiques (DCs) des muqueuses jouent un rôle essentiel dans les premières étapes de l'infection [33]. En effet, elles peuvent non seulement être infectées par le virus, mais également capturer le virus à leur surface par l'intermédiaire de lectines de type C ou d'autres facteurs d'attachement (Figure 1.7) [34]. Le virus peut dès lors profiter de la capacité des cellules dendritiques à migrer vers les organes lymphoïdes secondaires pour rejoindre les zones riches en lymphocytes T CD4+, qui constituent sa principale cible. En outre, les cellules T folliculaires auxiliaires (Tfh) des ganglions lymphatiques

sont une cible majeure pour la réplication virale [35]. Des études récentes réalisées chez le macaque montrent que la réplication virale peut être détectée dans les ganglions lymphatiques aussi rapidement que 1 à 3 jours après l'infection. De plus, 7 jours post inoculation, les plus hauts niveaux d'ARN viral sont détectés dans les ganglions lymphatiques, indiquant que le virus est initialement amplifié dans ce compartiment anatomique [36]. Dans les ganglions lymphatiques, les cellules dendritiques favorisent la dissémination du virus par trans-infection des cellules T CD4+ [37]. La trans-infection est un procédé par lequel les cellules dendritiques transfèrent les particules virales complètes à la surface de la cellule cible, tout en induisant un recrutement du récepteur CD4 et co-récepteurs CCR5 et CXCR4 à la surface cellulaire. Cette structure porte le nom de synapse infectieuse. Par ailleurs, les cellules dendritiques matures présentent des antigènes du VIH aux cellules T et favorisent la mise en place des réponses immunes antivirales.

Après s'être répliqué abondamment dans les ganglions lymphatiques, le virus se dissémine dans d'autres organes lymphoïdes secondaires, principalement le tissu lymphoïde associé à l'intestin (Gut-Associated Lymphoid Tissue, GALT). L'invasion de ce tissu par le virus entraîne une déplétion massive des lymphocytes T CD4+ du GALT [38, 39]. L'importante augmentation de la charge virale plasmatique est étroitement associée à une diminution transitoire du nombre de lymphocytes T CD4+ dans le sang périphérique, principalement suite aux effets cytopathiques du virus.

Lors du pic de virémie, qui survient après 21-28 jours d'infection, les symptômes d'une grippe peuvent se manifester tels que de la fièvre et des maux de gorge [40], mais la plupart du temps cette phase est asymptomatique. Suite à la mise en place d'une réponse immunitaire adaptative, qui est concomitante au pic de virémie et qui se caractérise par la production de lymphocytes T CD8+ cytotoxiques et d'anticorps spécifiquement dirigés contre le VIH, le taux de lymphocytes T CD4+ circulants remonte progressivement, tandis que la charge virale plasmatique diminue fortement avant de se stabiliser (« *the viral set point* ») après 12 à 20 semaines d'infection [41]. Le temps nécessaire pour atteindre cet état d'équilibre ainsi que la charge virale associée varient fortement d'un patient à l'autre et semblent être des facteurs pronostics de la progression de la maladie [42].



Copyright © Nature Publishing Group
Nature Reviews | Immunology

Figure 1.7. Le rôle des cellules dendritiques des muqueuses dans la réplication locale du VIH-1 et sa dissémination. Les cellules dendritiques des muqueuses épithéliales peuvent être infectées par le VIH-1, ainsi que capturer le virus à leur surface. Après avoir migré dans les ganglions lymphatiques, les cellules dendritiques favorisent la dissémination du virus par trans-infection des cellules T CD4+. Par ailleurs, les cellules dendritiques matures présentent des antigènes du VIH-1 aux cellules T et favorisent la mise en place des réponses immunes antivirales. *Issu de (Li Wu & Vineet N. KewalRamani, Nature Reviews Immunology, 2006).*

Infection chronique ou phase asymptomatique

La phase d'infection chronique est une phase asymptomatique qui dure environ 10 ans pour les individus non traités. Cette phase se caractérise par une activation massive du système immunitaire. Les mécanismes responsables de cette activation immunitaire sont nombreux et complexes : la réplication virale par elle-même [stimulation des cellules T et B spécifiques du VIH mais également des cellules immunitaires innées via la liaison aux *Toll Like Receptors* (TLRs)], la translocation des produits microbiens vers la circulation sanguine suite à la rupture immunologique de la barrière gastro-intestinale, la réactivation de certains agents viraux persistants normalement contrôlés par le système immunitaire (ex : CMV, EBV,...), et la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (IFN- α , TNF- α , IL-1, IL-6 and IL-18) [43]. Cette activation massive du système immunitaire est associée à une réduction linéaire du taux de lymphocytes T CD4+. L'hyperactivation immune se caractérise par une augmentation des médiateurs pro-inflammatoires, et une sénescence du système immunitaire similaire à celle observée chez les personnes âgées. Cette immunosénescence prédispose les individus infectés aux infections, aux cancers, aux maladies cardiovasculaires et neurodégénératives, ainsi qu'aux maladies auto-immunes [44]. Le développement de stratégies visant à diminuer l'activation immunitaire et par conséquent le vieillissement accéléré du système immunitaire semble donc important pour éviter l'apparition de ces maladies.

Stade avancé de l'infection ou stade SIDA

Cette dernière phase de l'infection débute lorsque le taux de lymphocytes T CD4+ devient inférieur à 200 cellules/ μ L, et va de pair avec une évolution accélérée de la maladie et un rapide déclin du taux de lymphocytes T CD4+. L'épuisement du système immunitaire résulte en une susceptibilité fortement augmentée vis-à-vis des infections opportunistes, ce qui conduit à la mort des individus infectés en l'absence de traitement.

2. Facteurs de restriction et de dépendance du VIH-1

2.1. Les facteurs de restriction

Les facteurs de restriction sont des molécules exprimées par les cellules de l'hôte et qui inhibent la réplication virale à diverses étapes du cycle répliatif [45]. Il existe 4 critères pour définir un facteur de restriction : 1) Ces facteurs doivent diminuer de plusieurs logs l'infectivité du virus ; 2) Le virus doit avoir développé des mécanismes qui permettent de contrer l'activité de ces facteurs ; 3) Ces facteurs doivent présenter la signature d'une évolution génétique qui est le résultat de cycles itératifs entre l'action des facteurs de restriction et la neutralisation de ces facteurs par le pathogène ; 4) L'expression de chacun de ces facteurs de restriction est intimement liée à la réponse immune innée, et généralement induite par l'interféron. Les facteurs de restriction

les mieux caractérisés sont APOBEC3 (*Apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like*), BST-2 (*Bone Marrow Stromal Cell Antigen 2*), et SAMHD1 (*SAM domain and HD domain-containing protein 1*).

Les protéines APOBEC3 sont une famille de 7 protéines qui catalysent la désamination des désoxyribonucléotides cytosine (C) en uracile (U). 4 protéines de cette famille sont impliquées dans la restriction du VIH : 3D, 3F, 3H, 3G. Le processus de désamination favorise le développement d'hypermutations au niveau de l'ADN proviral, limitant la capacité répliquative du virus. Pour contrecarrer l'effet de ces facteurs de restriction, la protéine Vif du VIH induit la polyubiquitinylation des protéines et leur dégradation subséquente par le protéasome.

La protéine BST-2 est une protéine membranaire associée aux radeaux lipidiques qui retient les particules virales matures à la surface des cellules et empêche leur relargage en liant à la fois la membrane cellulaire et les particules virales. Les virions capturés sont ensuite internalisés et dégradés dans les lysosomes cellulaires. La neutralisation de ce facteur de restriction est effectuée par la protéine virale Vpu, qui induit la dégradation ou la séquestration de BST-2 dans des compartiments périnucléaires.

Enfin, la protéine SAMHD1 présente une activité de dNTPase, favorisant la diminution des niveaux intracellulaires en dNTPs dans les cellules myéloïdes [46] et les lymphocytes T CD4 quiescents [47, 48]. Privée de dNTPs, la transcriptase inverse ne peut dès lors plus rétrotranscrire l'ARN viral en ADN complémentaire. Dans le cadre de l'infection par le VIH-2 ou par le SIV, la protéine virale Vpx neutralise ce facteur de restriction en induisant sa dégradation [49]. Néanmoins, le génome du VIH-1 ne code pas pour la protéine Vpx. Par conséquent, le VIH-1 reste sensible à la restriction induite par SAMHD1, expliquant la relative résistance des cellules myéloïdes à l'infection par le VIH. Par ailleurs, dans les cellules T, l'activité de SAMHD1 est régulée par son état de phosphorylation. En effet, sous forme non phosphorylée, SAMHD1 exerce son activité antivirale, tandis que ce facteur perd son activité antivirale lorsqu'il est sous forme phosphorylée. De façon intéressante, l'IL-2 et l'IL-7 induisent la phosphorylation de SAMHD1 et par conséquent la perte de son activité restrictive, augmentant la susceptibilité des cellules T CD4+ à l'infection [50].

En 2004, il a été montré que l'infection par le VIH-1 chez les singes de l'ancien monde est restreinte par la protéine TRIM5alpha (*Tripartite motif-containing protein 5*) [51]. A l'opposé, le VIH-1 semble être peu susceptible à la restriction induite par la protéine humaine TRIM5alpha. Néanmoins, de récents résultats ont redéfini le rôle de TRIM5alpha dans l'infection par le VIH chez l'humain. D'une part, il a été montré que ce facteur limite l'infection des cellules de Langerhans, une sous-population de cellules dendritiques présentes au niveau de l'épithélium du vagin et du prépuce [52]. En effet, dans ces cellules dendritiques, TRIM5alpha interfère avec les processus de décapsidation et de rétrotranscription en ciblant les particules virales vers les autophagosomes, ce qui favorise leur dégradation lysosomale subséquente. Enfin, une récente

étude a montré que l'activation de l'immunoprotéasome en présence d'interféron permet à la protéine humaine TRIM5alpha de limiter l'infection par le VIH dans les lymphocytes T CD4+, redéfinissant le rôle du TRIM5alpha humain dans la restriction à l'infection [53].

D'autres facteurs de restriction ont également été récemment identifiés [54]. C'est le cas de SLFN11 (*Schlafen family member 11*), qui présente une action antivirale à des stades tardifs de l'infection en inhibant la production des protéines virales. Il est intéressant de constater que, chez les individus qui contrôlent de façon spontanée le virus, SLFN11 est exprimé à haut niveau dans les cellules mononucléées du sang périphérique. Par ailleurs, IFITM1 à 3 (*Interferon-induced transmembrane protein*) sont des protéines transmembranaires, qui co-localisent avec les protéines virales Gag et Env à la surface cellulaire. Lors du processus de bourgeonnement viral, ces protéines sont emportées dans les nouveaux virions et limitent l'entrée du virus dans les cellules cibles en inhibant l'étape de fusion cellulaire. Enfin, Mx2 (*MX Dynamin Like GTPase 2*) est connu pour empêcher le processus de décapsidation.

2.2. Les facteurs de dépendance

Les facteurs de dépendance du VIH se définissent comme des protéines cellulaires qui augmentent ou diminuent le taux d'infection par le VIH [55]. Ces facteurs cellulaires de dépendance constituent des cibles de choix dans le cadre du développement de nouvelles approches thérapeutiques. En effet, cibler des protéines cellulaires plutôt que des protéines virales diminue le risque d'observer des mutations associées à un échappement viral.

Ces facteurs de dépendance ont été identifiés via des approches de criblages à large échelle. Ces criblages ont pour but d'étudier les effets d'une perte de fonction génique sur la réplication virale du VIH. Un facteur est considéré comme facteur de dépendance si sa perte de fonction diminue le pourcentage d'infection à moins de 50% ou s'il augmente le taux d'infection à plus de 200%. Cette perte de fonction génique est obtenue via l'utilisation de bibliothèques de shRNA (*small hairpin RNAs*) ou de siRNA (*small interfering RNA*). Au total, ces criblages ont permis d'identifier 1117 gènes potentiellement impliqués dans la réplication virale. Plusieurs facteurs de dépendance interagissent directement avec une protéine virale du VIH (e.g. Vpu, gp160, Gag, Tat, Vif, Env) [56]. Ces criblages ont également permis l'identification de RUVBL1 (*RuvB Like AAA ATPase 1*), une protéine faisant partie du complexe enzymatique NuA4 qui module l'activité transcriptionnelle via son activité d'histone acétyltransférase [56]. De multiples facteurs impliqués dans le métabolisme des nucléotides ont également été identifiés [56]. Néanmoins, il est rare que ces gènes candidats soient identifiés dans tous les criblages, suggérant un haut taux de résultats faux positifs ou faux négatifs. Une nouvelle stratégie de perte de fonction vise à utiliser la technique du CRISPR/Cas9 [57, 58]. Au contraire des shRNA ou des siRNA qui induisent une perte de fonction partielle, la technologie du CRISPR/Cas9 permet d'obtenir une perte de fonction

complète. De plus, cette approche semble plus sensible et plus spécifique que le criblage basé sur les ARNs d'interférence pour l'identification de gènes de dépendance. Grâce à cette approche, les auteurs ont identifié 3 nouveaux facteurs de dépendance (*activated leukocyte cell adhesion molecule*, ALCAM; *solute carrier family 35 member B2*, SLC35B2; et *tyrosylprotein sulfotransferase 2*, TPST2), qui sont non essentiels à la prolifération et la survie cellulaire.

3. La thérapie antirétrovirale

La thérapie antirétrovirale est un traitement efficace pour inhiber la réplication du VIH chez les individus infectés par le VIH. Bien que les premiers cas d'infection par le VIH-1 aient été rapportés en 1981, il a fallu attendre 1987 pour le que le premier agent antirétroviral (AZT, Zidovudine) soit développé et approuvé par la *Food and Drug Administration (FDA)*. A l'heure actuelle, il existe plus de 30 molécules antirétrovirales disponibles, qui agissent sur différentes étapes du cycle de réplication du virus (entrée, rétro-transcription, intégration, maturation). Ces molécules antirétrovirales peuvent être divisées en 6 classes distinctes : (1) Les inhibiteurs de la rétrotranscriptase nucléosidiques (NRTIs), (2) Les inhibiteurs de la rétrotranscriptase non-nucléosidiques (NNRTIs), (3) Les inhibiteurs d'intégrase, (4) Les inhibiteurs de protéase (PIs), (5) Les inhibiteurs de fusion, et (6) Les antagonistes du co-récepteur CCR5 [59]. La liste de ces agents antirétroviraux est reprise dans le tableau 1.2.

Suite à la haute capacité de la rétrotranscriptase à introduire des mutations dans le génome viral, la monothérapie est fréquemment associée à l'apparition de résistances [60]. En 1996, l'efficacité de la HAART (highly active antiretroviral therapy), qui combine 3 agents antirétroviraux, est rapportée au 11ème congrès AIDS, et ce traitement devient la norme de soin pour le VIH en 1997. Via l'utilisation d'une combinaison d'agents antirétroviraux, la réplication virale est fortement réprimée et la probabilité d'apparition de mutants résistants simultanément aux multiples inhibiteurs est extrêmement faible. Le traitement classique consiste à combiner 2 NRTIs avec un agent antirétroviral d'une classe différente pour créer une combinaison efficace qui agit à différentes étapes du cycle viral.

Bien que la thérapie antirétrovirale ait amélioré de façon considérable la qualité et la durée de vie des personnes infectées par le VIH [61], ce traitement est malgré tout associé à plusieurs inconvénients. Citons entre autres les effets secondaires et la toxicité du traitement [62] au niveau hépatique, rénal, cardiovasculaire, et osseux. Mais également le cout élevé du traitement, et un accès limité dans plusieurs régions du monde. En 2017, environ 60% des adultes et 52% des enfants infectés par le VIH avaient accès au traitement [1].

Tableau 1.2. Agents antirétroviraux approuvés par la FDA

1981: First AIDS cases are reported in the United States.				
'85-'89	1987 Zidovudine (NRTI)			
'90-'94	1991 Didanosine (NRTI)	1992 Zalcitabine (NRTI)	1994 Stavudine (NRTI)	
'95-'99	1995 Lamivudine (NRTI) Saquinavir (PI)	1996 Indinavir (PI) Nevirapine (NNRTI) Ritonavir (PI)	1997 Combivir (FDC) Delavirdine (NNRTI) Nelfinavir (PI)	1998 Abacavir (NRTI) Efavirenz (NNRTI) 1999 Amprenavir (PI)
'00-'04	2000 Didanosine EC (NRTI) Kaletra (FDC) Trizivir (FDC)	2001 Tenofovir DF (NRTI)	2003 Atazanavir (PI) Emtricitabine (NRTI) Enfuvirtide (FI) Fosamprenavir (PI)	2004 Epzicom (FDC) Truvada (FDC)
'05-'09	2005 Tipranavir (PI)	2006 Atripla (FDC) Darunavir (PI)	2007 Maraviroc (CA) Raltegravir (INSTI)	2008 Etravirine (NNRTI)
'10-'14	2011 Complera (FDC) Nevirapine XR (NNRTI) Rilpivirine (NNRTI)	2012 Stribild (FDC)	2013 Dolutegravir (INSTI)	2014 Cobicistat (PE) Elvitegravir (INSTI) Triumeq (FDC)
'15-'19	2015 Evotaz (FDC) Genvoya (FDC) Prezcobix (FDC)	2016 Descovy (FDC) Odefsey (FDC)	2017 Juluca (FDC) 2018 Biktarvy (FDC) Cimduo (FDC) Delstrigo (FDC) Doravirine (NNRTI) Ibalizumab-uiyk (PAI) Symfi (FDC) Symfi Lo (FDC) Symtuza (FDC) Temixys (FDC)	2019 Dovato (FDC)

Drug Class Abbreviations:

CA: CCR5 Antagonist; **FDC:** Fixed-Dose Combination; **FI:** Fusion Inhibitor; **INSTI:** Integrase Inhibitor; **NNRTI:** Non-Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitor; **NRTI:** Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitor; **PE:** Pharmacokinetic Enhancer; **PI:** Protease Inhibitor; **PAI:** Post-Attachment Inhibitor



Note: Drugs in gray are no longer available and/or are no longer recommended for use in the United States by the HHS HIV/AIDS medical practice guidelines. These drugs may still be used in fixed-dose combination formulations.

Issu de <https://aidsinfo.nih.gov/understanding-hiv-aids/infographics/25/fda-approval-of-hiv-medicines>.

4. Persistance virale

Bien que la thérapie antirétrovirale permette de diminuer la charge virale plasmatique à des niveaux indétectables (<50 copies/mL), elle n'élimine pas complètement le virus de l'organisme (Figure 1.8) [63-67]. Par conséquent, tout arrêt du traitement se solde quasi systématiquement par un rebond de la charge virale plasmatique dans les quelques semaines après l'interruption, forçant les personnes infectées à prendre leur traitement à vie. Cette persistance du virus est due à l'existence de réservoirs cellulaires et anatomiques dans lesquels le virus peut persister pour de longues périodes de temps en demeurant invisible au système immunitaire et au traitement [68].

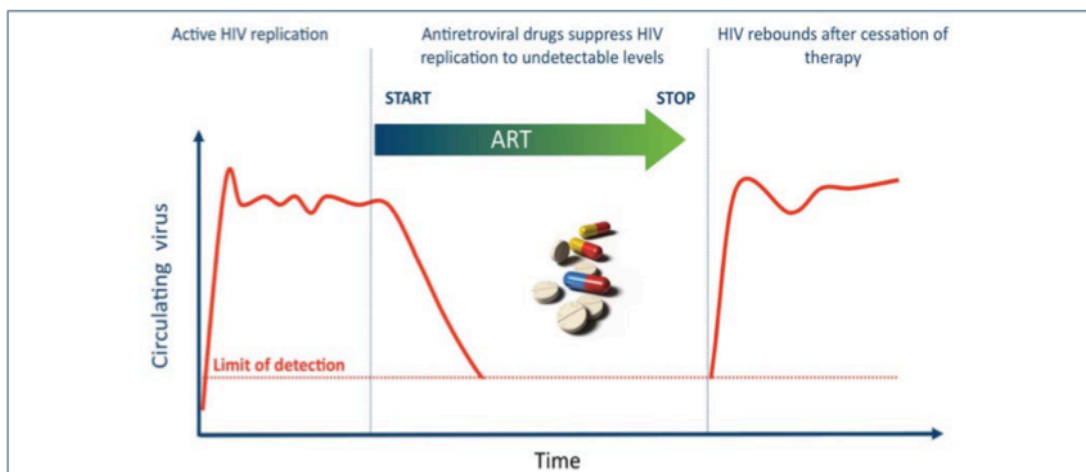


Figure 1.8. Évolution de la charge virale plasmatique avant, pendant, et après interruption de la thérapie antirétrovirale. La thérapie antirétrovirale diminue la charge virale plasmatique à des niveaux indétectables, mais n'élimine pas complètement le virus de l'organisme. Par conséquent, tout arrêt du traitement se solde par un rebond de la charge virale plasmatique. *Issu de (Kulpa DA et Chomont N, Journal of Virus Eradication, 2015).*

4.1. Réservoirs anatomiques et cellulaires

Réservoirs anatomiques

Bien que le sang périphérique constitue le réservoir anatomique le mieux décrit, plusieurs tissus et organes sont des sites de persistance préférentiels du VIH chez les individus sous thérapie antirétrovirale [69]. Les lymphocytes T CD4⁺ circulants représentent moins de 2% de toutes les cellules CD4⁺ du corps [70], démontrant l'importance d'étudier la persistance du VIH dans les réservoirs tissulaires. Parmi les réservoirs tissulaires, citons les organes lymphoïdes primaires (thymus et moelle osseuse) et secondaires (ganglions lymphatiques, amygdales, rate), le système gastro-intestinal et le foie, le système nerveux central, les poumons, les reins, les systèmes reproducteurs masculins et féminins, et le tissu adipeux. Les facteurs responsables de la persistance virale dans ces tissus sont mentionnés ultérieurement dans le paragraphe 4.3.

Le thymus

Le thymus est un organe lymphoïde primaire qui participe à la maturation des lymphocytes T, permettant de fournir de nouvelles cellules immunitaires en périphérie. Les co-récepteurs CCR5 et CXCR4 sont exprimés à différents niveaux à la surface des différentes sous-populations cellulaires présentes dans le thymus [71]. Plusieurs études ont effectivement montré que le thymus soutient la réplication du VIH et du SIV *in vivo* en l'absence de traitement [72, 73]. Néanmoins, peu de données existent concernant la persistance à long-terme du virus sous ART dans ce compartiment anatomique. Plusieurs modèles animaux ont été utilisés pour étudier la persistance du VIH dans le thymus. Dans une étude effectuée sur des macaques sous thérapie antirétrovirale, les auteurs n'ont pas détecté d'ADN viral ni de virus compétent pour la réplication dans le thymus [74]. Dans une autre étude effectuée sur des macaques infectés par le SHIV (*Simian-Human Immunodeficiency Virus*), l'ARN Gag n'a été détecté que dans un seul animal sur les 6 étudiés, et l'ARN multi-épissé n'a pas pu être détecté [75]. Enfin, dans une étude réalisée sur un modèle de souris humanisées BLT (*bone marrow-liver-thymus*), l'ARN du VIH a été détecté dans 6/9 animaux sous ART [76]. Ces discordances entre études peuvent s'expliquer par le modèle animal utilisé, ainsi que les méthodes testées pour détecter la persistance virale. Des études complémentaires chez l'humain sont nécessaires pour déterminer l'implication du thymus dans la persistance à long-terme du VIH chez les individus infectés par le VIH sous ART.

La moelle osseuse

La moelle osseuse est un tissu spongieux présent à l'intérieur des os, qui joue un rôle majeur dans l'hématopoïèse, c'est-à-dire la production des différentes composantes cellulaires du sang. Plusieurs sous-populations cellulaires de la moelle osseuse sont impliquées dans la persistance à long-terme du VIH et du SIV sous traitement. Dans un modèle de macaques infectés par le SIV et sous ART, les cellules T CD4+ mémoires de la moelle osseuse contiennent des niveaux d'ADN viral similaires à ceux observés dans les lymphocytes T CD4+ mémoires du sang [77]. Par ailleurs, les cellules souches hématopoïétiques et cellules progénitrices (HSPCs) de la moelle osseuse, avec leurs propriétés de survie à long terme et d'auto-renouvellement, pourraient constituer des réservoirs de prédilection pour le virus. Bien qu'une étude publiée en 2012 n'ait pas détecté d'ADN viral ni de virus compétent pour la réplication dans les HSPCs provenant de 11 individus sous ART [78], d'autres études suggèrent que cette population cellulaire pourrait servir de réservoir pour la persistance à long-terme du VIH. En effet, il a été montré que les cellules souches CD34+ isolées de la moelle osseuse d'individus sous ART contiennent de l'ADN viral intégré [79]. En 2017, une étude effectuée par Sebastian *et al* a estimé la taille du réservoir viral dans les HSPCs à 2.4 copies d'ADN proviral par million de cellules [80]. De plus, les auteurs ont

montré que les HSPCs contiennent de l'ADN proviral intact, suggérant la potentielle implication de ces cellules dans le rebond viral observé après interruption du traitement [80].

Les ganglions lymphatiques

Les ganglions lymphatiques sont des organes lymphoïdes secondaires qui jouent un rôle déterminant dans la reconnaissance des agents pathogènes et dans la mise en place de l'immunité adaptative et humorale. La reconnaissance des antigènes par les cellules B entraîne leur prolifération au niveau des centres germinatifs folliculaires, la maturation d'affinité (processus par lequel les cellules B produisent des anticorps ayant une affinité croissante pour les antigènes), et le développement de cellules B plasmiques et de cellules B mémoires [81]. Les cellules T folliculaires auxiliaires (Tfh), via leurs interactions avec les cellules B, sont connues pour jouer un rôle important dans cette cascade d'événements [82]. En effet, ces cellules fournissent des signaux qui sont indispensables à la survie des cellules B, telle qu'une production d'IL-21, d'IL-4, CD40L, et CXCL13, mais également d'IL-2 et de TNF. Les cellules B qui ne reçoivent pas l'aide des cellules Tfh meurent rapidement. Les Tfh des ganglions lymphatiques se caractérisent par l'expression du facteur de transcription Bcl6, et par une série de marqueurs de surface incluant CXCR5, PD-1 et ICOS. Ces cellules peuvent être classifiées en 2 sous-populations sur base de leur localisation : les Tfh situées dans les centres germinatifs expriment de hauts niveaux de CXCR5 et de PD-1, tandis que les Tfh situées en dehors des centres germinatifs expriment des niveaux intermédiaires de ces 2 molécules [83].

Chez les individus infectés par le VIH et non traités, les tissus lymphoïdes sont un site majeur de réplication virale [84-86]. En 1991, il a été montré par Pantaleo *et al.* que la fréquence de cellules contenant de l'ADN viral est 5 à 10X plus élevée dans les tissus lymphoïdes que dans le sang périphérique [84]. De plus, dans les stades précoces et intermédiaires de la maladie, l'ARN viral est pratiquement indétectable dans le sang périphérique alors que de hauts niveaux d'ARN viral sont détectables dans les ganglions lymphatiques des mêmes individus [85]. Dans les stades avancés de la maladie, les niveaux d'ARN viral sont augmentés par rapport aux stades plus précoces dans le sang périphérique, mais ces niveaux restent bien inférieurs à ceux détectés dans les ganglions lymphatiques [85]. *Ex vivo*, les cellules Tfh sont hautement permissives à l'infection par le VIH, et sont plus susceptibles à l'infection que les cellules T CD4+ extrafolliculaires [87]. En 2013, il a été montré par Perreau *et al* que, chez les individus non traités, cette population cellulaire est un site prédominant de réplication et de production virale [35]. Dans cet article, les auteurs ont montré que la fréquence de cellules Tfh est largement augmentée chez les individus infectés non traités comparativement aux sujets sains, et cette fréquence de Tfh corrèle avec la fréquence de cellules B des centres germinatifs et avec la virémie. De plus, la population de cellules CXCR5+PD-1+ contient de plus hauts niveaux d'ADN viral que les autres

sous-populations testées (CXCR5-PD-1-, CXCR5+PD-1-, CXCR5-PD-1+). La production virale et la réplication virale étaient également plus élevées dans cette population cellulaire.

Les ganglions lymphatiques sont également un site majoritaire de persistance virale chez les individus VIH+ sous ART. En effet, plusieurs études montrent que les cellules isolées de ce compartiment anatomique contiennent des virus compétents pour la réplication [35, 63]. La persistance de cellules produisant spontanément de l'ARN du VIH/SIV indique également qu'il existe une transcription résiduelle continue dans ce compartiment [88-91]. Une pénétration sous-optimale des agents antirétroviraux au sein de ce site anatomique pourrait être en partie responsable de cette transcription spontanée [92]. Enfin, les cellules Tfh sont un site important de persistance virale chez les individus sous ART [88]. Banga *et al* ont étudié le rôle des Tfh dans la persistance virale dans une cohorte d'individus traités pour une médiane de temps de 5 ans. Ils ont montré que les cellules PD-1+ (enrichies en Tfh) contiennent de plus hauts niveaux d'ARN associé aux cellules que les autres sous-populations étudiées. En réponse à la stimulation CD3/CD28, les cellules PD-1+ produisent également de plus hauts niveaux de virus infectieux. De façon intéressante, la fréquence de cellules Tfh diminue avec le temps sous traitement, ainsi que les niveaux d'ARN et de p24 détectés dans le surnageant de culture des cellules PD-1+. Cette observation indique que la contribution des cellules Tfh à la persistance virale pourrait diminuer avec le temps sous traitement.

Plusieurs propriétés expliquent pourquoi les ganglions lymphatiques constituent un sanctuaire anatomique de prédilection pour la réplication et la persistance à long-terme du VIH. En effet, ce compartiment anatomique présente un microenvironnement idéal pour la persistance du VIH. D'une part, les cellules T CD8+ cytotoxiques sont relativement exclues des follicules B des ganglions lymphatiques [93, 94], favorisant la persistance du VIH au niveau de ce site spécifique. Certaines études suggèrent également que les lymphocytes T CD8+ cytotoxiques folliculaires présentent une altération de fonction [95], bien que ces données soient controversées [96]. Une étude publiée en 2018 par Buggert *et al.* démontre que les lymphocytes T CD4+ cytolytiques sont peu représentés dans les tissus lymphoïdes comparativement au sang périphérique [97]. De plus, plusieurs études ont montré que les cellules dendritiques folliculaires retiennent à leur surface des virions infectieux, et ce même sous ART, permettant le réapprovisionnement des réservoirs viraux [98, 99]. Enfin, l'infection par le VIH est associée à une expansion massive des cellules T CD4+ et CD8+ régulatrices, qui inhibent la production d'anticorps [100, 101].

Le système gastro-intestinal

Le tissu lymphoïde associé aux intestins (GALT) contient une haute concentration en lymphocytes T CD4+ [102], et représente donc une cible idéale pour l'infection par le VIH. Le GALT est en effet l'un des premiers tissus à être infecté suite à l'exposition par le VIH, ce qui résulte en une perte rapide et massive des lymphocytes T [38, 39]. Cette diminution rapide des cellules immunitaires est associée à des dommages de la barrière intestinale, favorisant la translocation microbienne et une activation immunitaire systémique et chronique [43]. Par ailleurs, la thérapie antirétrovirale ne permet pas de restaurer l'intégrité structurelle de la barrière intestinale, ni de restaurer complètement les niveaux de cellules CD4+ [103, 104]. De plus, l'activation immunitaire persiste au niveau de ce compartiment anatomique malgré le traitement à long-terme [105]. Plusieurs études ont montré la persistance à long-terme du VIH dans l'intestin sous ART. Une étude publiée par Chun *et al* en 2008 a effectivement montré que les niveaux d'ADN viral dans les lymphocytes T CD4+ de l'intestin sont environ 5 à 6 fois plus élevés que dans le sang [106]. Par ailleurs, la détection de cellules produisant des ARN viraux indique qu'il existe une transcription résiduelle spontanée au sein de ce compartiment [107-110].

Le système nerveux central

De nombreux désordres neurologiques sont associés à l'infection par le VIH [111], suggérant la capacité du virus à traverser la barrière hématoencéphalique et à persister dans le cerveau. Plusieurs sous-populations cellulaires du cerveau peuvent être infectées par le VIH. Les cellules microgliales, une population spécialisée de macrophages retrouvés au niveau du système nerveux central (CNS), expriment le récepteur CD4 et sont les principales cibles de l'infection par le VIH dans le cerveau [112]. Il est intéressant de constater que ces cellules microgliales sont plus susceptibles à l'infection par le VIH que d'autres populations macrophagiques (macrophages dérivés des monocytes, macrophages péritonéaux, macrophages alvéolaires), bien que ces diverses populations expriment des niveaux comparables du facteur de restriction SAMHD1 [113]. Dès lors, la restriction induite par SAMHD1 dans les cellules microgliales n'est pas suffisante pour limiter l'infection de ces cellules, montrant l'importance d'identifier les déterminants responsables de la susceptibilité accrue de ces cellules à l'infection. Chez les patients sous thérapie antirétrovirale, l'ADN et l'ARN du VIH ont été détectés dans le fluide cérébrospinal et dans le cerveau post-mortem [114-116]. Il est possible que la persistance de cellules RNA+ dans le système nerveux central soit due à une concentration sous-optimale des agents antirétroviraux au niveau de ce site anatomique, comme identifié dans plusieurs études [117-119]. Plusieurs facteurs peuvent limiter la circulation des ARV vers le CNS [120]: les jonctions serrées de la barrière hématoencéphalique, peu de molécules antirétrovirales sous forme non liées à des protéines et disponibles pour traverser la barrière, l'expression de pompes à efflux qui expulsent directement les agents vers la circulation.

Les poumons

Les maladies pulmonaires sont une comorbidité majeure à l'infection par le VIH décrite depuis le début de l'épidémie [121]. Citons notamment la maladie pulmonaire obstructive, l'hypertension pulmonaire et le cancer pulmonaire. Dans le cadre de l'infection non traitée, le VIH a été détecté dans les macrophages bronchoalvéolaires [122]. Plusieurs études suggèrent également la persistance du VIH dans les poumons chez les patients sous thérapie antirétrovirale. En effet, l'ADN du VIH a été détecté post-mortem dans les poumons d'un patient sous ART [123], et l'ADN et l'ARN du VIH ont été détectés dans les macrophages alvéolaires d'individus traités [124]. Récemment, une étude réalisée par Costiniuk *et al* a montré que les niveaux d'ADN viral sont 13 fois plus élevés dans les lavages broncho-alvéolaires que dans le sang [125]. De plus, les lymphocytes T CD4+ des lavages contiennent des plus hauts niveaux d'ADN intégré que les lymphocytes T CD4+ périphériques.

Systemes reproducteurs masculins et féminins

Le VIH infecte une variété de cellules dans les systèmes reproducteurs masculin et féminin, et se retrouve également dans le sperme et les sécrétions génitales de la femme. Sous thérapie antirétrovirale, l'ARN du VIH peut être détecté dans les tissus génitaux et les sécrétions [69]. Une transcription active au niveau de ce site anatomique peut être partiellement expliquée par une pénétration sous-optimale des agents antirétroviraux dans ce compartiment [126, 127] et le développement de mutations de résistance [128]. Plus récemment, une étude publiée par Ganor *et al.* a étudié le phénomène de persistance virale dans l'urètre en utilisant des tissus pénien provenant d'individus infectés par le VIH et sous thérapie antirétrovirale [129]. Cette étude rapporte que les macrophages de l'urètre peuvent contenir de l'ADN intégré, de l'ARN, des protéines et des virions intacts, alors que le VIH n'a pas été détecté dans les cellules T de l'urètre.

Tissu adipeux

Le tissu adipeux est impliqué dans diverses fonctions incluant le stockage et la libération d'énergie, la régulation de l'appétit et d'autres signaux neuroendocriniens, ainsi que la modulation de l'immunité. Les lymphocytes T constituent une large composante du tissu adipeux, et sont une cible pour l'infection par le VIH/SIV [130]. Par ailleurs, le VIH/SIV peut persister à long terme dans ce compartiment anatomique, à la fois dans les lymphocytes T et les macrophages. En effet, plusieurs études ont détecté de l'ADN viral dans le tissu adipeux chez les sujets sous thérapie antirétrovirale, avec des niveaux similaires d'ADN dans les lymphocytes T CD4+ du tissu adipeux et du sang [131]. L'ARN viral a également pu être détecté par hybridation *in situ*, suggérant l'existence d'une transcription active au sein de ce compartiment anatomique [131]. Par ailleurs, la présence de virions infectieux a pu être détectée dans des cultures de lymphocytes T CD4+ provenant du tissu adipeux de macaques sous ART [132], indiquant que certains provirus sont

intacts et capables de se répliquer. Dès lors, ce réservoir anatomique pourrait également jouer un rôle important dans le rebond viral observé après arrêt du traitement. Une étude publiée en 2002 a étudié la capacité de pénétration de diverses classes d'agents antirétroviraux dans ce compartiment anatomique, montrant que les NNRTIs pénètrent mieux que les inhibiteurs d'intégrase, tandis que les NRTIs sont indétectables [133]. Enfin, une étude récente indique que les adipocytes réduisent l'efficacité du NRTI tenofovir [134], qui est souvent l'une des composantes principales des multithérapies. De plus, l'inhibiteur d'intégrase Dolutegravir pénètre plus efficacement dans le tissu adipeux que les NRTIs, démontrant l'intérêt d'utiliser ce médicament dans le cadre de la thérapie antirétrovirale [134]. Cette distribution différentielle des agents antirétroviraux au sein du tissu adipeux peut être due aux propriétés physiques de ces agents. En effet, le tenofovir est relativement hydrophile, tandis que le dolutegravir est relativement hydrophobe. L'expression de pompes à efflux par les adipocytes pourraient également influencer la pénétration de ART dans le tissu adipeux.

Réservoirs cellulaires

Chez les individus sous thérapie antirétrovirale, le VIH-1 persiste essentiellement dans les lymphocytes T CD4⁺ mémoires au repos [135]. Ces cellules constituent un réservoir de choix pour le virus puisqu'elles peuvent survivre pendant de très longues périodes de temps. D'autres types cellulaires pourraient également servir de réservoirs pour le virus, mais leur implication dans la persistance à long terme du VIH reste controversée.

Les lymphocytes T CD4⁺ mémoires

Cette population cellulaire a été identifiée comme réservoir viral en 1995 suite à la détection d'ADN viral intégré par PCR [136]. En 1997, le développement du *Quantitative Viral Outgrowth Assay* (QVOA) a permis de mesurer la taille des réservoirs viraux compétents pour la réplication dans le sang périphérique d'individus sous thérapie antirétrovirale (*antiretroviral therapy*, ART), et d'estimer cette fréquence à environ 1 cellule par million de lymphocytes T CD4⁺ au repos [63]. Il est intéressant de noter que les lymphocytes T CD4⁺ au repos sont relativement peu permissifs à l'infection par le VIH. En effet, ces cellules expriment non seulement de très faibles niveaux du co-récepteur CCR5, mais elles présentent également des blocs au niveau de la transcription inverse et de l'import nucléaire [137]. En effet, les cellules T CD4 au repos expriment de grandes quantités du facteur de restriction SAMHD1, qui inhibe l'étape de transcription inverse [48]. Dès lors, plusieurs modèles ont été proposés pour expliquer la persistance du virus dans ces cellules. L'un des modèles suggèrent qu'une fraction des cellules T activées infectées de manière productive survivent assez longtemps pour devenir des cellules T mémoires au repos. Un second modèle propose que l'infection survienne lorsque la cellule T

activée se trouve déjà dans le processus de transition vers le stade de cellule mémoire au repos [138]. Néanmoins, certaines études indiquent que des cellules au repos peuvent être directement infectées sans avoir besoin d'être activées [139]. En effet, de faibles signaux activateurs tels que des cytokines (e.g. IL-2, IL-4, IL-7, IL-15, et IL-6 dans une moindre mesure) et des chimiokines (e.g. ligands de CCR7 : CCL19, et CCL21) peuvent rendre les cellules plus susceptibles à l'infection sans induire de changements perceptibles au niveau du phénotype d'activation de ces cellules [140, 141].

Autres types cellulaires servant de réservoirs pour le virus

Parmi les autres types cellulaires pouvant servir de réservoirs pour le virus, citons entre autres les monocytes-macrophages de la lignée des cellules myéloïdes. Bien que certaines études aient rapporté la présence d'ADN viral dans les monocytes isolés à partir du sang périphérique de personnes infectées sous ART [142-145], d'autres études n'ont pas reproduit les mêmes résultats ([146] et Marta Massanella, données non publiées). Cette discordance pourrait entre autres s'expliquer par les difficultés techniques à obtenir des populations pures de monocytes après enrichissement (contamination des monocytes par des lymphocytes T CD4+ mémoires infectés). Par ailleurs, la détection d'ADN viral dans les monocytes pourrait être le résultat de l'ingestion de cellules CD4+ infectées, puisque les monocytes sont capables de reconnaître les cellules apoptotiques et de les phagocyter. Enfin, la faible fréquence d'infection des monocytes chez les individus VIH+ sous ART rend l'étude de la persistance dans ces cellules techniquement compliquée.

Les macrophages présentent de nombreuses caractéristiques qui favoriseraient la persistance à long-terme du VIH [147]. En effet, ces cellules peuvent persister pour de longues périodes de temps (demi-vie de 6 semaines à plusieurs années), sont distribuées partout dans le corps, et sont relativement résistantes à l'apoptose induite par le VIH [148]. De plus, l'infection par le VIH favorise la survie des macrophages en augmentant l'activité télomérase [149] et en augmentant l'expression de gènes anti-apoptotiques [150]. En effet, une étude publiée en 2007 a montré que, dans les macrophages infectés par le VIH, l'enveloppe virale induit la sécrétion d'une cytokine pro-survie, M-CSF (*macrophage colony-stimulating factor*) [150]. Cette cytokine diminue l'expression du récepteur TRAIL (*tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand*) qui est impliqué dans l'apoptose cellulaire, et augmente l'expression de gènes anti-apoptotiques Bfl-1 et Mcl-1. Par ailleurs, les macrophages expriment de hauts niveaux de pompes d'efflux, limitant la concentration intracellulaire des agents antirétroviraux, ce qui pourrait favoriser la réplication virale à faible niveau et l'apparition de mutants résistants [151].

Bien que les cellules dendritiques du sang périphérique ne semblent pas constituer un réservoir viral chez les individus sous ART [152], les cellules dendritiques folliculaires des ganglions lymphatiques jouent un rôle dans la persistance du VIH. En effet, ces cellules sont

capables de retenir des virions infectieux à leur surface pour des périodes prolongées de temps, et ce même sous ART [98, 99]. Bien que ces virions retenus à la surface ne soient pas capables de se répliquer, ils peuvent infecter des cellules se trouvant à proximité et favoriser le réapprovisionnement des réservoirs viraux.

D'autres populations cellulaires ont également été proposées comme réservoirs viraux, telles que les cellules progénitrices hématopoïétiques [153], une petite sous-population de cellules NK exprimant le récepteur CD4 [154] et les mastocytes [155].

4.2. Sous-populations de lymphocytes T CD4+ mémoires servant de réservoirs

Les lymphocytes T CD4+ mémoires, principaux réservoirs du VIH-1, sont un ensemble hétérogène de sous-populations cellulaires qui se distinguent en fonction de leur stade de différenciation cellulaire ou de leur fonctionnalité (Figure 1.9) [156].

Ces cellules peuvent être divisées en plusieurs sous-populations cellulaires en fonction de leur stade de différenciation : les lymphocytes T CD4+ mémoires souches (T_{SCM}), mémoires centraux (T_{CM}), mémoires transitionnels (T_{TM}) et mémoires effecteurs (T_{EM}). Les T_{SCM} constituent une population rare de cellules T mémoires (2-3% des lymphocytes circulants), présentant des caractéristiques de cellules souches (auto-renouvellement, survie à long-terme, etc) et une forte capacité de prolifération en réponse à une stimulation antigénique [157]. En 2013, Buzon *et al* ont montré que cette population cellulaire est hautement enrichie en ADN du VIH chez les individus sous thérapie antirétrovirale [158]. De plus, l'extrême stabilité de cette population cellulaire favoriserait la persistance à long-terme du VIH [159]. Les T_{CM} , T_{TM} et T_{EM} présentent des différences en termes de capacité de survie, de prolifération et de migration, mais également au niveau de leur profil cytokinique et de leur profil transcriptionnel. Les cellules T_{CM} , grâce à l'expression de CCR7 et CD62L, peuvent migrer vers les ganglions lymphatiques. De plus, ces cellules ont des fonctions effectrices limitées mais présentent une haute capacité de prolifération en réponse à une seconde stimulation antigénique [160]. À l'opposé, les cellules T_{EM} migrent vers les tissus périphériques, produisent des cytokines effectrices en réponse à une stimulation antigénique, mais ont une capacité proliférative limitée [160]. Les cellules T_{TM} présentent un phénotype intermédiaire entre les T_{CM} et les T_{EM} en termes de différenciation cellulaire mais également dans leur capacité à proliférer en réponse à l'IL-15 *in vivo* [161]. En 2009, il a été montré que le VIH peut persister de manière latente dans les trois sous-populations de lymphocytes T CD4+ mémoires [162].

Les lymphocytes T CD4+ mémoires peuvent également être divisés en plusieurs sous-populations en fonction de leur fonctionnalité : les lymphocytes T auxiliaires (Th1, Th2, Th9, Th17, Th1Th17 et Th22), les lymphocytes T régulateurs (Treg), les lymphocytes T folliculaires auxiliaires (Tfh) [163]. Chacune de ces sous-populations de lymphocytes T sécrètent des cytokines

spécifiques qui peuvent avoir des fonctions pro ou anti-inflammatoires. Dans une étude publiée en 2017, Lee *et al* ont étudié les niveaux d'ADN viral dans diverses sous-populations cellulaires (Th1, Th2, Th9, Th17, Treg), purifiées sur base de leur expression cytokinique [164]. Dans cette étude, les plus hauts niveaux d'ADN viral ont été identifiés dans les cellules Th9 (Th9>Th17>Th2>Th1>Treg), une sous-population qui sécrète l'IL-9. Néanmoins, bien que les cellules Th1 contiennent de relativement faibles niveaux d'ADN viral comparativement aux autres sous-populations, ces cellules Th1 contiennent les plus hautes fractions de génomes intacts (65%). Par ailleurs, aucun génome intact n'a pu être détecté dans les cellules Th9, et de faibles proportions de génomes intacts ont été détectées dans les Th17, Th2, et Treg. D'autres études ont montré que les lymphocytes CD4+ mémoires Th17, avec leur longue durée de vie [165] et leurs propriétés accrues de plasticité/auto-renouvellement/survie [166, 167], constituent des réservoirs de choix pour le VIH-1 [168, 169]. Les lymphocytes Th1/Th17 semblent également jouer un rôle dans la persistance du VIH chez les individus sous ART [170, 171]. Les lymphocytes Treg contiennent également de plus hauts niveaux d'ADN proviral que les lymphocytes T non régulateurs [172]. Comme mentionné ci-dessus, les lymphocytes Tfh des ganglions lymphatiques constituent des réservoirs de prédilection pour la persistance du VIH chez les individus sous ART [88], grâce à leur longue durée de vie et leur localisation au niveau de sites immunoprivilégiés (voir 3.3). Enfin, une étude a montré que les lymphocytes Tfh du sang périphérique contiennent de plus hauts niveaux de virus inducible comparativement aux cellules non Tfh [173].

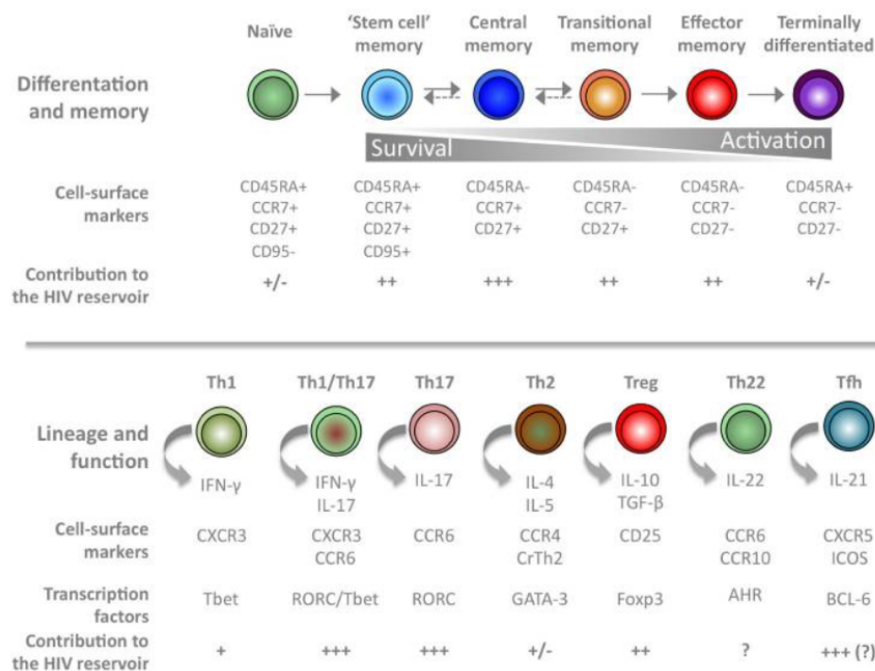


Figure 1.9. Sous-populations de lymphocytes T CD4+ mémoires et leur contribution au réservoir du VIH. Les lymphocytes T CD4+ mémoires peuvent être divisés en plusieurs sous-populations en fonction de leur stade de différenciation ou en fonction de leur fonctionnalité. Chacune de ces sous-populations se caractérise par l'expression de marqueurs de surface spécifiques et la production de cytokines spécifiques. *Issu de (Kulpa DA et Chomont N, Journal of Virus Eradication, 2015).*

4.3. Mécanismes de persistance virale

Chez les individus sous ART, le virus peut persister par deux mécanismes principaux et non exclusifs : réplication résiduelle à bas bruit et latence.

Réplication résiduelle à bas bruit

Dans le sang périphérique, une minorité (7%) des cellules T CD4⁺ produisent spontanément des ARNs multi-épissés tat/rev. Néanmoins, de nombreuses études ont rapporté la présence de cellules capables de produire des ARNs viraux dans divers sites anatomiques, soutenant l'hypothèse d'une transcription résiduelle à bas bruit dans les tissus. Par ailleurs, notre laboratoire a récemment eu accès à des biopsies de divers organes provenant de deux individus VIH⁺ sous ART *post mortem*. De l'ARN viral a pu être détecté dans la majorité des tissus analysés (Maria Julia Ruiz, données non publiées), suggérant une transcription active des provirus intégrés dans ces tissus.

La réplication résiduelle à bas bruit peut survenir dans plusieurs circonstances. Elle peut être observée lorsque la pénétration des agents antirétroviraux est suboptimale, ce qui peut avoir lieu suite à une faible adhérence au traitement, à des interactions médicamenteuses ou à des barrières pharmacologiques qui limitent l'accès des agents antirétroviraux au niveau des tissus cibles. Il a effectivement été montré que les agents antirétroviraux ont des capacités variables à pénétrer dans divers sites anatomiques, et que ces niveaux de pénétration varient entre individus [92, 117, 118, 174-176]. D'autre part, certains sites anatomiques présentent un microenvironnement privilégié pour la persistance à long terme et la transcription active du VIH, comme c'est le cas des follicules B des ganglions lymphatiques [96]. En effet, dans les follicules, la fréquence des cellules T CD8⁺ cytotoxiques est plus faible que dans les régions extrafolliculaires [94], et ces cellules pourraient également être moins fonctionnelles [96].

Une réplication résiduelle à bas bruit dans les ganglions lymphatiques devrait théoriquement être accompagnée d'une évolution génétique virale au sein de ce sanctuaire anatomique, mais également au niveau du sang périphérique suite à la recirculation des cellules ou des virions néoproducts entre compartiments anatomiques. Néanmoins, la majorité des études publiées montrent une absence d'évolution génétique virale dans les ganglions lymphatiques [177-179] et dans le sang [180-182], suggérant l'absence de réplication virale au sein de ce compartiment anatomique. De plus, la majorité des études d'intensification de traitement ne montrent pas d'effet sur la virémie résiduelle [183-187], suggérant à nouveau l'absence de réplication résiduelle chez les individus sous ART. Cependant, une transcription/production virale résiduelle pourrait avoir lieu dans ce compartiment, et ce en l'absence de réplication résiduelle et d'évolution génétique virale. Ces faibles quantités de composantes virales (ARN et

éventuellement protéines) pourraient contribuer à l'activation immune et l'inflammation qui persiste à des niveaux anormaux chez les individus infectés sous ART [188, 189].

Des études supplémentaires sont nécessaires pour déterminer si les cellules ARN+ sont également capables de produire des protéines virales et des virions infectieux compétents pour la réplication dans les divers sites anatomiques soutenant la persistance à long terme du VIH. Pinzone *et al* ont récemment publié une étude dans laquelle ils ont séquencé de façon longitudinale les provirus du sang périphérique chez 4 individus infectés par le VIH et sous thérapie antirétrovirale [190]. Dans cette étude, ils ont montré que les provirus intacts sont soumis à une plus grande pression de sélection négative que les provirus défectifs. Cette élimination préférentielle des génomes intacts suggère que ces génomes proviraux intacts expriment des composantes virales à un moment donné, favorisant leur élimination subséquente par les effets cytopathiques du virus et/ou la reconnaissance par le système immunitaire.

La latence virale

La latence s'établit très tôt au cours de l'infection par le VIH, puisque l'initiation de ART dans les 10 jours après infection ne suffit pas à empêcher l'établissement de ces réservoirs latents [191]. Des études chez les macaques ont comparé l'établissement des réservoirs latents lorsque le traitement est initié à 3, 7, 10, et 14 jours après l'infection par voie intrarectale [192]. Bien que les niveaux d'ADN proviral soient indétectables dans le sang lorsque le traitement est initié 3 jours après l'infection, des niveaux d'ADN faibles mais détectables sont déjà observés dans les ganglions lymphatiques et l'intestin, indiquant le rapide établissement de ces réservoirs latents. Chez les macaques ayant initié le traitement plus tardivement, l'ADN proviral est détecté dans tous les compartiments anatomiques. De plus, après arrêt du traitement à la semaine 24, un rebond de la charge virale a été observé chez tous les macaques, ce qui confirme que des réservoirs compétents pour la réplication sont établis très tôt au cours de l'infection. Une autre étude réalisée chez des macaques SIV+, dans laquelle ART est initiée entre 4 et 9 jours après l'infection, rapporte qu'une initiation précoce du traitement limite l'établissement des réservoirs viraux (*i.e.* 1/6 singes ont une mesure d'ADN détectable dans les ganglions lymphatiques dans le groupe ayant initié le traitement 4/5 jours post-infection, versus 8/13 dans le groupe ayant initié le traitement le 6^{ème} jour post-infection) [193]. En conclusion, ces études suggèrent qu'une initiation rapide du traitement post-infection limite mais n'empêche pas complètement l'établissement des réservoirs viraux.

Les réservoirs latents peuvent se maintenir durant ART par des mécanismes différents [162, 194]: capacité de survie prolongée et/ou prolifération cellulaire. La prolifération des cellules infectées de manière latente peut être induite de plusieurs façons: 1) Stimulation cytokinique ou des signaux mitogènes [162, 195, 196], 2) Stimulation antigénique (CMV, EBV, HPV, produits

bactériens...) 3) Intégration du génome viral dans des gènes de croissance cellulaire ou des gènes impliqués dans l'oncogenèse [197-199].

La capacité des cellules infectées de manière latente à se maintenir par prolifération cellulaire est soutenue par deux études initiales montrant que la virémie plasmatique résiduelle observée chez les individus sous ART est souvent dominée par une séquence virale unique [200, 201]. En 2013, une étude longitudinale a montré que la proportion de séquences monotypiques augmente au cours du temps dans le sang des individus sous ART, soutenant l'hypothèse d'une prolifération cellulaire [202]. En 2017, Hosmane *et al.* ont également confirmé que les cellules infectées de manière latente peuvent proliférer en réponse à des signaux mitogéniques en l'absence de production virale [195]. Une étude publiée en 2014 par Maldarelli *et al* a étudié les sites d'intégration dans les cellules infectées chez 5 participants sous ART, et a montré que 40% des sites d'intégration sont retrouvés plus d'une fois. Cette observation confirme qu'une large fraction des cellules infectées prolifèrent par expansion clonale. De plus, une large fraction des événements d'intégration ont été observés dans les gènes BACH2 (*BTB Domain And CNC Homolog 2*) et MKL-2 (*myocardin-like protein 2*), qui sont impliqués dans la croissance et le développement des cellules T. D'autres études ont également confirmé que l'intégration du génome viral dans des gènes de croissance cellulaire ou des gènes pro-cancer favoriserait la prolifération des cellules infectées de manière latente [198, 199].

Il est important de mentionner qu'une étude publiée en 2015 démontre qu'une grande proportion des génomes proviraux retrouvés dans ces clones cellulaires sont défectifs [203], soulevant l'importance de déterminer si ces clones cellulaires peuvent contenir des virus compétents pour la réplication. En 2016, Simonetti *et al* ont rapporté le cas particulier d'un individu sous ART qui présente un large clone cellulaire contenant un virus compétent pour la réplication [204]. Une autre étude publiée en 2016 a montré que 54% des virus compétents pour la réplication appartiennent à des clones cellulaires qui contiennent les mêmes séquences *env* [205], et ces résultats ont été confirmés par Hosmane *et al* [195]. De plus, une récente étude a montré que : 1) Les cellules infectées de manière latente contenant des virus compétents pour la réplication peuvent proliférer en réponse à des cytokines ou des antigènes, et ce en l'absence de production virale ; 2) Ces clones contenant des virus compétents pour la réplication peuvent persister pour de longues périodes (mois à années), tandis que d'autres clones croissent et décroissent (introduction du concept de « *wax and wane* »)[196]. Finalement, une étude longitudinale publiée par Pinzone *et al* a également observé une expansion de certains clones contenant des provirus intacts [190]. Les auteurs ont montré que les génomes intacts retiennent le potentiel de produire des ARNs viraux et d'être éliminés au cours du temps. Cette transcription pourrait jouer un rôle important dans la persistance à long terme du VIH puisqu'elle est essentielle au phénomène d'épissage. En effet, si le provirus est intégré dans un gène de croissance cellulaire ou un

oncogène, l'épissage entre un site donneur du VIH et un site accepteur de l'oncogène pourrait favoriser la division cellulaire et l'expansion de ces clones contenant un provirus intact.

4.4. Latence pré-intégrationnelle et post-intégrationnelle

Dans le cadre du VIH, deux formes de latence peuvent être distinguées : la latence pré-intégrationnelle, et la latence post-intégrationnelle [206 , 207].

Latence pré-intégrationnelle

La latence pré-intégrationnelle survient lorsque des altérations précoces du cycle viral retardent ou empêchent l'étape d'intégration du génome viral dans l'ADN cellulaire, à savoir une réaction incomplète de rétro-transcription suite à un manque en desoxyribonucléotide triphosphate (dNTPs), une incapacité à transporter le complexe de pré-intégration dans le noyau suite à un manque d'adénosine triphosphate (ATP) [207]. Dans les cellules à haut taux de division, ces formes non intégrées disparaissent rapidement suite à l'absence de duplication des génomes viraux au cours de la division cellulaire [208]. Dans les macrophages, les formes non intégrées présentent une remarquable stabilité et peuvent persister pendant au moins 30 jours [209]. Néanmoins, il semble que ce phénomène de latence pré-intégrationnelle contribue de façon minoritaire à la persistance virale chez les individus sous thérapie antirétrovirale. En effet, dans les cellules au repos, les ARNs rétro-transcrits ont une durée de demi-vie d'environ 1 jour, résultant en une perte rapide de ces formes non-intégrées [210]. Plusieurs études ont en effet montré que le ratio ADN total/ADN intégré est proche de 1 chez les individus sous ART, montrant l'absence de formes non intégrées chez ces individus [211 , 212].

Latence post-intégrationnelle

La latence post-intégrationnelle survient lorsque l'expression virale est réprimée après intégration du génome viral dans l'ADN de la cellule hôte [206 , 207]. Ces cellules contiennent dans leur génome un provirus intégré de façon stable, mais silencieux en termes de transcription et de traduction de telle sorte qu'il n'y a pas de production de virions infectieux. Cette définition initiale de la latence post-intégrationnelle a récemment été remise en question par l'introduction du concept de « *leaky latency* », qui suggère que ces réservoirs latents pourraient néanmoins produire de faibles quantités de composantes virales (ARN et éventuellement protéines) qui pourraient contribuer aux dysfonctions immunitaires observées chez les individus infectés sous ART [156, 213, 214]. Il est intéressant de noter que 98% de ces virus intégrés sont défectifs, et qu'il est dès lors peu probable que ces provirus défectifs participent au rebond viral observé après interruption du traitement [215]. Néanmoins, 2% des provirus présentent un génome intact et peuvent potentiellement produire des virus compétents pour la réplication après réactivation.

4.5. Mécanismes moléculaires de la latence post-intégrationnelle

L'établissement de la latence post-intégrationnelle est un phénomène multifactoriel impliquant à la fois des **mécanismes épigénétiques** (marques épigénétiques répressives, existence d'un nucléosome répresseur nuc-1 en aval du site d'initiation de la transcription), et des **mécanismes non-épigénétiques** (séquestration dans le cytoplasme de facteurs de transcription inductibles tels que NF- κ B et NFAT, présence de protéines répressives (CTIP-2, NELF, DSIF), absence du transactivateur Tat, séquestration du facteur P-TEFb sous la forme d'un complexe inactif)(Figure 1.10) [206].

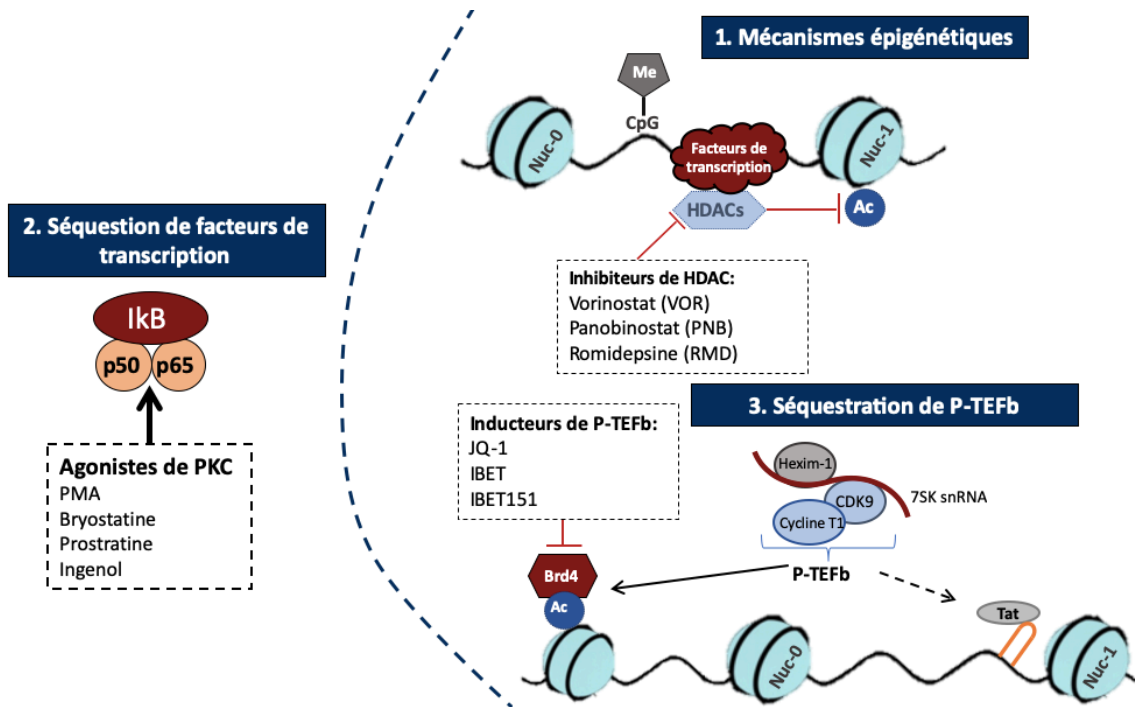


Figure 1.10 Mécanismes épigénétiques et non épigénétiques contribuant à la latence post-intégrationnelle du VIH-1. La latence post-intégrationnelle est un phénomène multifactoriel impliquant à la fois des mécanismes épigénétiques (marques épigénétiques répressives comme l'hypoacétylation des histones et la méthylation de l'ADN), ainsi que des mécanismes non-épigénétiques (séquestration dans le cytoplasme de facteurs de transcription inductibles tel que NF- κ B et la séquestration du facteur P-TEFb sous la forme d'un complexe inactif). Chacun de ces mécanismes peut être ciblé par des agents anti-latence pour favoriser la réactivation de l'expression virale.

4.5.1. Mécanismes épigénétiques

L'épigénétique étudie les modifications de l'expression des gènes n'impliquant aucun changement dans la séquence primaire de l'ADN. Ces modifications modulent l'expression des gènes en modifiant le statut de condensation de la chromatine, et sont réversibles [216]. Les modifications épigénétiques regroupent la méthylation de l'ADN ainsi que les modifications post-traductionnelles des queues N-terminales des histones (méthylation, acétylation, ubiquitinylation,

crotonylation...). Dans ce chapitre, nous discuterons essentiellement de la méthylation de l'ADN et de l'acétylation des histones, ainsi que de l'implication de ces deux processus épigénétiques dans la latence du VIH. Il est à noter que la crotonylation des histones au niveau du LTR du VIH a été récemment identifiée comme modification régulatrice de la latence virale [217].

Méthylation de l'ADN et des histones

La méthylation de l'ADN est généralement associée à un état de répression transcriptionnelle, soit en entravant la liaison de facteurs de transcription, soit en favorisant le recrutement de protéines épigénétiques répressives [218]. En 2009, une étude a identifié l'hyperméthylation de deux îlots CpG situés de part et d'autre du site d'initiation de la transcription du provirus latent à la fois dans des lignées cellulaires J-Lat et dans un modèle primaire de cellules CD4+ infectées de manière latente [219]. Néanmoins, dans les lymphocytes T CD4+ provenant d'individus infectés, l'implication de la méthylation de l'ADN dans la latence du VIH semble moins évidente. Bien qu'une étude réalisée sur cellules d'individus infectés et traités par ART ait observé un haut degré de méthylation du promoteur du VIH [220], d'autres études rapportent de faibles niveaux de méthylation du promoteur *ex vivo* [221, 222]. Plusieurs facteurs pourraient expliquer ces résultats contradictoires, entre autres le temps sous traitement. Ainsi, une étude plus récente a montré que les niveaux de méthylation de l'ADN du LTR 5' du VIH sont relativement faibles chez des individus sous traitement depuis peu (moins de 3 ans) et que ces niveaux de méthylation augmentent avec le temps sous traitement, mettant en évidence le dynamisme de ce processus épigénétique [223].

La méthylation des histones est également impliquée dans la latence virale [224]. Les marques de méthylation des histones peuvent soit avoir un effet activateur (H3K4me1, H3K4me2, H3K4me3, H3K9me1, H3K36me3) ou répresseur (H3K27me2, H3K27me3, H3K9me2, H3K9me3, and H4K20me3) sur l'activité transcriptionnelle [225]. Récemment, l'implication du complexe *Human Silencing Hub* (HUSH) dans la latence du VIH a été proposée. En effet, ce complexe pourrait maintenir la répression transcriptionnelle en recrutant l'histone méthyltransférase SETDB1, une enzyme associée à la marque épigénétique répressive H3K9me3 [226]. Dans ce sens, la déplétion de HUSH dans une lignée cellulaire latente J-Lat est associée à une diminution des niveaux de H3K9me3 et à une réactivation de l'expression virale [227]. Par ailleurs, une récente étude a également montré que l'histone déméthylase MINA53 promeut la latence virale en déméthylant la marque H3K36Me3, une marque épigénétique associée à l'activation transcriptionnelle [228].

Acétylation des histones

L'acétylation des histones consiste en l'ajout d'un groupement acétyle au niveau d'un résidu lysine, ce qui neutralise la charge positive de la lysine de l'histone, entravant son interaction avec les charges négatives des phosphates de l'ADN (Figure 1.11). Par conséquent, l'acétylation des histones est associée au relâchement de la chromatine et à un état transcriptionnellement actif, en favorisant le recrutement de facteurs de transcription au niveau des régions promotrices. Inversement, la désacétylation des histones est associée à un état plus condensé de la chromatine et donc à une répression de la transcription.

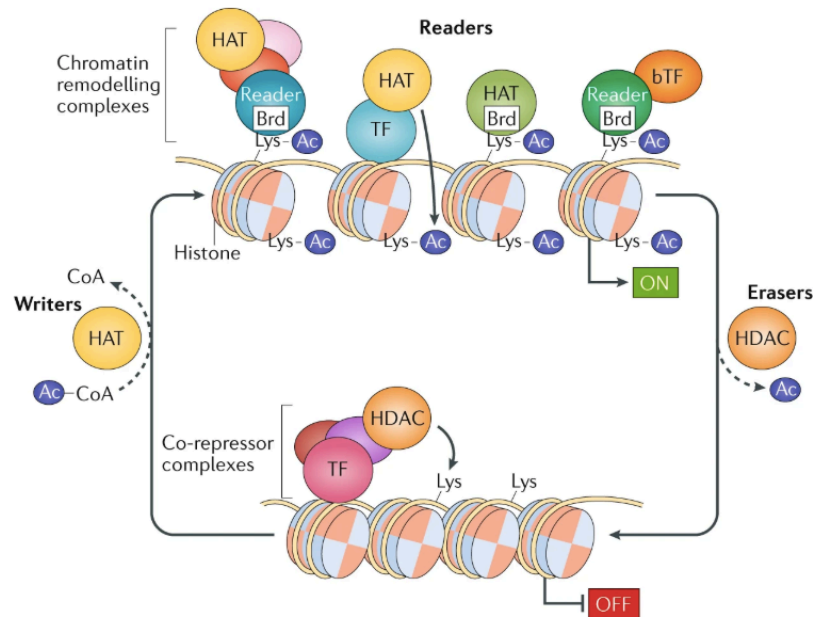


Figure 1.11. Contrôle de l'expression génique via l'acétylation des histones. L'acétylation des histones est catalysée par les histones acétyltransférases (HATs) et est associée à un relâchement de la chromatine et à une activation transcriptionnelle. Inversement, la désacétylation des histones est catalysée par des histones désacétylases (HDACs) et est associée à un état plus condensé de la chromatine, ce qui favorise la répression transcriptionnelle. *Issu de (Wilfried Ellmeier et Christian Seiser, Nature Reviews, 2018).*

En condition de latence, les histones désacétylases (HDACs) sont recrutées au niveau du LTR5' par l'intermédiaire de facteurs de transcription cellulaires (NF- κ B, c-myc, Sp1) favorisant un état hypoacétylé des histones et la répression transcriptionnelle [229] (Figure 1.12). Dans les cellules microgliales humaines, la protéine répresseur CTIP-2 recrute les HDACs 1 et 2 au niveau du LTR5' du promoteur viral [230]. Suite à la réactivation du VIH, les facteurs de transcription recrutent des histones acétyltransférases (HATs) au niveau du LTR 5'. L'hyperacétylation des histones aboutit au relâchement de la chromatine, et par conséquent à la transcription du génome viral.

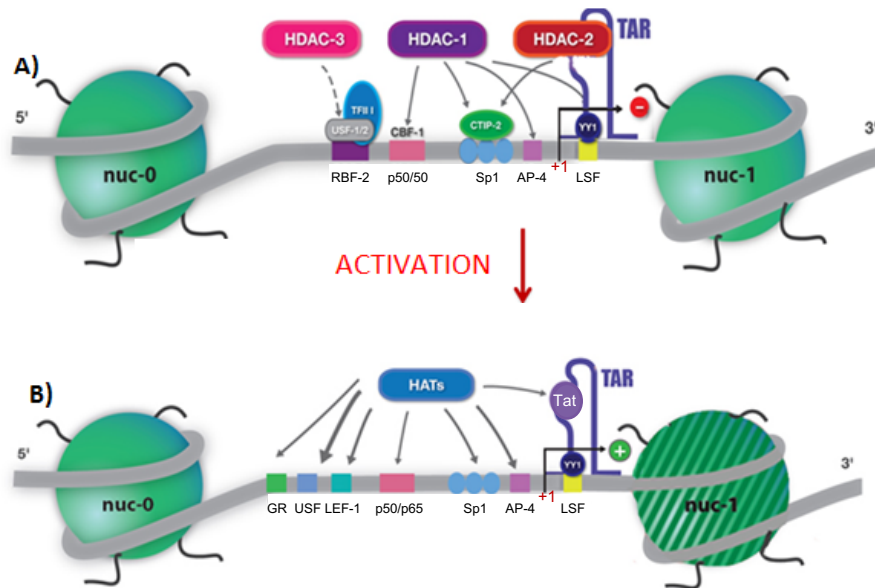


Figure 1.12. Recrutement de HATs ou de HDACs au niveau du LTR5'. A) En condition de latence, les facteurs de transcription cellulaires recrutent les HDACs de classe I (HDACs 1, 2 et 3) au niveau du LTR 5' du VIH. La désacétylation du nucléosome répresseur nuc-1 participe à la fermeture de la chromatine, et par conséquent à l'établissement de la latence. B) Après activation, les facteurs de transcription recrutent à présent des HATs au niveau du LTR5'. L'hyperacétylation des histones entraîne le relâchement de la chromatine et le remodelage de nuc-1, ce qui favorise la transcription du génome viral. *Adapté de (Colin et Van Lint, Retrovirology, 2009).*

4.5.2. Mécanismes non épigénétiques

Dans ce chapitre, nous discuterons de plusieurs mécanismes non épigénétiques impliqués dans la latence du VIH, incluant la séquestration dans le cytoplasme de facteurs cellulaires essentiels à la transcription du génome viral, ainsi que l'implication de divers micro-ARNs cellulaires (miRNAs).

Séquestration de facteurs de transcription dans le cytoplasme

Dans les cellules infectées de manière latente, le facteur de transcription cellulaire NF- κ B, sous forme d'hétérodimère p50/p65, est séquestré dans le cytoplasme par son inhibiteur I κ B [231]. Par ailleurs, les homodimères p50/p50 occupent les sites de liaison à NF- κ B au niveau du promoteur viral et recrutent l'histone désacétylase HDAC1, favorisant la condensation de la chromatine et un état de répression transcriptionnelle [232]. Lors de la réactivation du VIH, I κ B est phosphorylé et dégradé par le protéasome, permettant à NF- κ B de migrer vers le noyau et de se lier au niveau du promoteur du VIH qui contient deux sites de liaison à NF- κ B [231, 233].

Le facteur positif d'élongation de la transcription (P-TEFb) joue également un rôle majeur dans la latence du VIH. P-TEFb est un complexe formé de deux composantes essentielles (CDK9 et Cycline T1), et son action est requise pour l'élongation transcriptionnelle de la majorité des gènes cellulaires [234] (Figure 1.13). Dans les cellules infectées de manière latente, P-TEFb est présent à très faible niveau car l'expression de la Cycline T1 est réprimée par divers miRNAs [235, 236]. De plus, en conditions de latence, P-TEFb est séquestré sous la forme d'un large complexe inactif dans lequel P-TEFb est associé au complexe 7SK RNP, qui est formé du petit ARN nucléaire (snRNA) 7SK, HEXIM1/2, LARP7 et MePCE. Au sein de ce complexe, l'activité enzymatique de CDK9 est inhibée suite à l'obstruction de la poche de liaison à l'ATP par HEXIM1 [237]. Par conséquent, l'activation de la voie P-TEFb nécessite deux étapes importantes : 1) L'augmentation des niveaux de Cycline T1 et 2) La libération de P-TEFb de son complexe inactif, ce qui s'accompagne de l'activation et phosphorylation de CDK9 au niveau de la serine 175 [238]. La protéine Tat du VIH peut alors recruter P-TEFb au niveau du promoteur viral, et la phosphorylation de la queue carboxy-terminale de la RNA polymérase II par CDK9 promeut le démarrage de la phase d'élongation de la transcription. Au même titre que Tat, Brd4 peut également dissocier P-TEFb de son complexe inactif et le recruter vers des promoteurs cellulaires [239]. En effet, Brd4 est une protéine intranucléaire, capable de se lier aux résidus lysines acétylées des histones H3 et H4 via ses bromodomains [240].

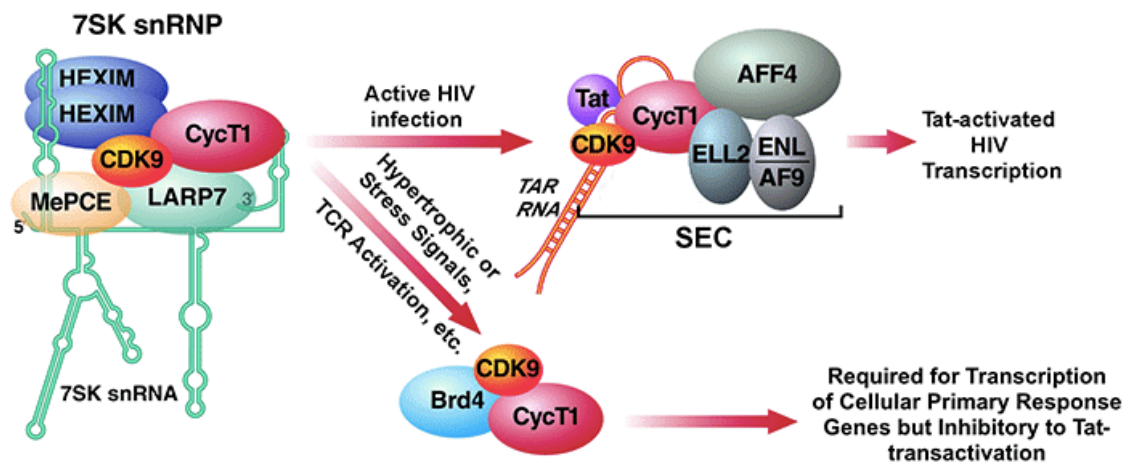


Figure 1.13. Mécanisme d'action du complexe P-TEFb. P-TEFb, formé de CDK9 et Cycline T1, est séquestré sous la forme d'un large complexe inactif dans lequel P-TEFb est associé au complexe 7SK RNP, qui est formé du petit ARN nucléaire (snRNA) 7SK, HEXIM1/2, LARP7 et MePCE. La protéine Tat du VIH peut recruter P-TEFb au niveau du promoteur viral, et la phosphorylation de la queue carboxy-terminale de la RNA polymérase II par CDK9 promeut le démarrage de la phase d'élongation de la transcription. Au même titre que Tat, Brd4 peut dissocier P-TEFb de son complexe inactif et le recruter vers des promoteurs cellulaires. Issu de <http://mcb.berkeley.edu/labs/zhou/research.html>

Implication des miRNAs dans la latence du VIH

Les miRNAs sont des ARNs non codants simple brin d'environ 22 nucléotides qui régulent l'expression des gènes au niveau post-transcriptionnel en ciblant les ARN messagers. Un haut degré d'appariement entre le miRNA et l'ARNm cible induit la dégradation de l'ARNm, tandis qu'un degré d'appariement moindre est associé à l'inhibition de la traduction protéique [241]. Les miRNAs sont impliqués dans de nombreux processus cellulaires incluant le développement, la différenciation, le métabolisme, la prolifération, la tumorigénèse, les réponses immunes et la mort cellulaire [242].

Plusieurs miRNAs cellulaires ont un impact sur le cycle réplcatif viral en ciblant directement les transcrits viraux ou en ciblant des facteurs cellulaires jouant un rôle essentiel dans certaines étapes du cycle de réplication [243, 244]. En 2007, plusieurs miRNAs cellulaires ont été identifiés comme contribuant à la latence du VIH dans les lymphocytes T CD4+ mémoires isolés d'individus sous ART (miR-28, 125b, 150, 223, 382)[245]. En 2015, il a été montré que la perte de fonction des enzymes impliquées dans la biogenèse des miRNAs est associée à la réactivation du VIH dans la lignée cellulaire latente J-Lat, soulignant à nouveau le rôle des miRNAs dans la latence virale *in vitro*. Un criblage à large échelle a ensuite permis d'identifier plusieurs miRNAs différemment exprimés entre cellules réactivées et cellules latentes, et par conséquent potentiellement impliqués dans le phénomène de latence, notamment le miR-155 [246]. En se liant à la région 3' UTR de TRIM32, miR-155 inhibe l'expression de cette protéine, qui ne peut dès lors plus exercer son activité d'ubiquitylation sur l'inhibiteur IκB. Par conséquent, IκB n'est plus dégradé, ce qui augmente la séquestration de NF-κB dans le cytoplasme et favorise la latence du VIH [246]. Plus récemment, le miR-29a, capable de cibler directement une séquence dans Nef [247], a également été suggéré comme ayant un rôle potentiel dans la latence du VIH [248, 249]. Dès lors, l'utilisation d'inhibiteurs sélectifs de ces miRNAs pourrait être envisagée dans le cadre des stratégies thérapeutiques visant à réactiver les réservoirs viraux.

5. Stratégies thérapeutiques ciblant les réservoirs viraux

Plusieurs études ont montré qu'il faudrait plus de 70 ans sous ART pour éliminer complètement les réservoirs viraux [250, 251], obligeant les individus infectés par le VIH à prendre leur traitement sans interruption durant toute leur vie. Par conséquent, il semble impératif de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques ciblant les réservoirs viraux. Deux types de stratégies ont été proposés : la guérison stérilisante et la guérison fonctionnelle (ou rémission).

5.1. Guérison stérilisante

La guérison stérilisante réfère à l'élimination complète des réservoirs viraux compétents pour la réplication. Jusque récemment, le patient de Berlin représentait le seul exemple de guérison stérilisante (Figure 1.14). Timothy Brown, infecté par le VIH et atteint de leucémie myéloïde aigue, a reçu deux transplantations de cellules souches hématopoïétiques d'un donneur présentant la mutation delta 32 au niveau du corécepteur CCR5, mutation qui rend les cellules résistantes à l'infection par le VIH [252-254]. Récemment, un deuxième cas a été rapporté : atteint d'un lymphome de Hodgkin et infecté par le VIH, le patient de Londres a également subi une transplantation de cellules souches hématopoïétiques provenant d'un donneur résistant [255]. Après 18 mois d'interruption de traitement, aucun rebond viral n'a été observé et aucune trace de VIH n'a pu être détectée. Plusieurs tentatives similaires d'éradication du VIH chez des individus présentant des lymphomes ou des leucémies ont été effectuées (Tableau 1.3). Malheureusement, ces tentatives sont extrêmement risquées (risque de mortalité de 10-12% au moment de la transplantation, et 40-45% après un an) et ne permettent pas toujours l'élimination des réservoirs viraux. De plus, la probabilité de trouver des donneurs présentant la mutation CCR5delta32 (environ 1% de la population caucasienne) et ayant une compatibilité HLA avec le receveur est très faible. Par conséquent, ce modèle de traitement semble difficile à répéter [256].

Tableau 1.3. Tentatives d'élimination des réservoirs viraux par transplantation de cellules souches hématopoïétiques CCR5delta32

Localisation	Raison de la transplantation	Age	Résultat de la transplantation
Berlin (Timothy Brown)	Leucémie myéloïde aigue	40	Virémie indétectable pour >12 ans après transplantation et arrêt de ART
Utrecht	Syndrome myélodysplasique	53	Rechute du syndrome myélodysplasique et décès 2 mois après la greffe
Münster	Lymphome Non-Hodgkinien	51	Infection et décès 4 mois après la greffe
Minneapolis	Leucémie lymphoblastique aigue	12	GVHD et décès 3 mois après la greffe
Santiago	Lymphome Non-Hodgkinien	46	Pneumonie et décès rapidement après la greffe
Barcelona	Lymphome Non-Hodgkinien	37	Rechute et décès 3 mois après la greffe
Essen	Lymphome Non-Hodgkinien	27	Rebond viral CXCR4 27 jours après arrêt de ART. Rechute et décès 12 mois après la greffe
Halifax	Leucémie myéloïde chronique	58	Diminution du réservoir viral 9 mois après la greffe. Décès d'infarctus du myocarde 1,5 ans après la greffe
London	Lymphome de Hodgkin		Virémie indétectable pour 18 mois après transplantation et arrêt de ART
Düsseldorf	Leucémie myéloïde aigue	49	Virémie indétectable pour 4 mois après transplantation et arrêt de ART

Adapté de (Scarborough et al, Virologie, 2019)

D'autres stratégies de guérison stérilisante sont fondées sur la modification du génome de l'hôte afin de rendre ses cellules résistantes à l'infection par le VIH [257]. Plusieurs méthodes de modification de l'ADN (Zinc finger nuclease *ZFN*, transcription activator-like effector nucleases *TALENs*, Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/*CRISPR*-associated protein nuclease-9 *CRISPR/Cas9*) sont à l'essai pour modifier le génome des lymphocytes T CD4+ ou des cellules souches hématopoïétiques dérivées de la moelle ou du sang périphérique. Ces cellules éditées d'origine autologue sont ensuite réinfusées chez les individus infectés. En 2014, cette stratégie d'édition a été testée dans un essai clinique de phase I chez 6 individus infectés par le VIH [258]. Dans cette étude, des lymphocytes T CD4+ autologues ont été modifiés par la stratégie *ZFN* afin d'abroger l'expression du corécepteur CCR5. Bien que les cellules CD4+ modifiées persistent après ré-infusion et soient trouvées en plus grand nombre que les cellules non modifiées, un rebond de la charge virale plasmatique a été observé chez tous les participants après interruption de ART. Néanmoins, après rebond viral, la charge virale a diminué progressivement jusqu'à atteindre des niveaux indétectables chez un participant, suggérant la potentielle efficacité de cette stratégie. Une étude *in vitro* a également montré que l'édition simultanée de CCR5 et CXCR4 par *CRISPR/Cas9* permet de rendre les cellules résistantes à l'infection par le VIH, quel que soit le tropisme cellulaire du VIH [259]. Enfin, il est également possible de cibler directement le génome proviral [260], par exemple en induisant son inactivation par *CRISPR/Cas9* [261]. L'excision du génome viral par *CRISPR/Cas9* dans plusieurs modèles de souris humanisées a été rapportée en 2017 [262]. Néanmoins, il a été montré en 2016 que le VIH est capable d'échapper à l'inhibition induite par *CRISPR/Cas9* suite au développement de mutations de résistance [263]. Une alternative serait d'abroger l'expression de plusieurs cibles à la fois (provirus, CCR5, CXCR4...) pour diminuer la probabilité de rebond viral suite à l'interruption de traitement.

5.2. Guérison fonctionnelle ou rémission

Étant donné les difficultés associées à l'élimination complète des réservoirs viraux (multiplicité des réservoirs cellulaires et anatomiques), la guérison fonctionnelle semble une approche plus réaliste. Le principe de la guérison fonctionnelle consiste à diminuer suffisamment la taille des réservoirs viraux de manière à permettre au système immunitaire de contrôler la réplication virale et d'empêcher la progression de la maladie en l'absence de ART. Dans ce contexte, il serait possible d'envisager des fenêtres d'interruption du traitement, sans risque de rebond de la charge virale.

L'hypothèse de la faisabilité d'une telle approche repose sur l'existence d'exemples concrets. Citons plusieurs cas pédiatriques de rémission. Le bébé du Mississippi, positif pour le VIH à la naissance et mis sous ART dans les premiers jours de sa vie jusqu'à l'âge de ses 18 mois (Figure 1.14) [264]. Après interruption du traitement, aucune trace du VIH n'a été détectée pendant 2 ans avant d'observer un rebond de la charge virale plasmatique [265]. En 2015, un autre cas pédiatrique a été rapporté : un enfant français ayant reçu ART à l'âge de 3 mois et ayant interrompu son traitement vers 6 ans. 11 ans après interruption, sa charge virale demeure indétectable et son taux de CD4 est stable [266]. Enfin, un enfant sud-africain ayant reçu ART pendant 40 semaines à sa naissance présente une charge virale indétectable et aucun symptôme d'infection par le VIH près de 9 ans plus tard (IAS 2017) [267]. D'autres exemples concrets de rémission sont observés chez les « *post-treatment controllers* » (PTCs), qui sont des individus infectés ayant initié un traitement au cours de la primo-infection (généralement entre 3-6 mois après infection) et capables de contrôler la réplication virale pendant plusieurs années après interruption du traitement (Figure 1.14). La description initiale des PTCs provient d'une étude conduite en 2010 (cohorte VISCONTI) ayant identifié 14 individus capables de contrôler la réplication virale pour une médiane de temps de 4.5 ans après arrêt de ART [268]. Les PTCs diffèrent fortement des contrôleurs élités (individus qui contrôlent spontanément l'infection) pour toute une série de paramètres [269]. Tout d'abord, les PTCs ont une charge virale plus élevée et un taux de CD4+ plus faible que les contrôleurs élités pendant la phase aiguë de l'infection. La majorité de ces PTCs n'ont pas les allèles protecteurs HLA B qui sont souvent associés au contrôle spontané de l'infection (HLA-B*27 et B*57). De façon intéressante, les allèles de risques (HLA-B*07 et HLA-B*35) sont hautement représentés dans ce groupe de PTCs (HLA-B*07 : 3/14 PTCs, HLA-B*35 : 5/14 PTCs). De plus, les réponses CD8 spécifiques pour le VIH sont plus faibles chez les PTCs que chez les contrôleurs élités, et sont pratiquement indétectables chez certains PTCs. Plusieurs nouveaux cas de PTCs ayant initié leur traitement en phase aiguë d'infection ont été décrits par la suite [270]. Tous ces exemples soutiennent l'hypothèse qu'une diminution des réservoirs viraux facilite le contrôle de la réplication virale par le système immunitaire en absence de traitement, et soutiennent la faisabilité d'une guérison fonctionnelle.

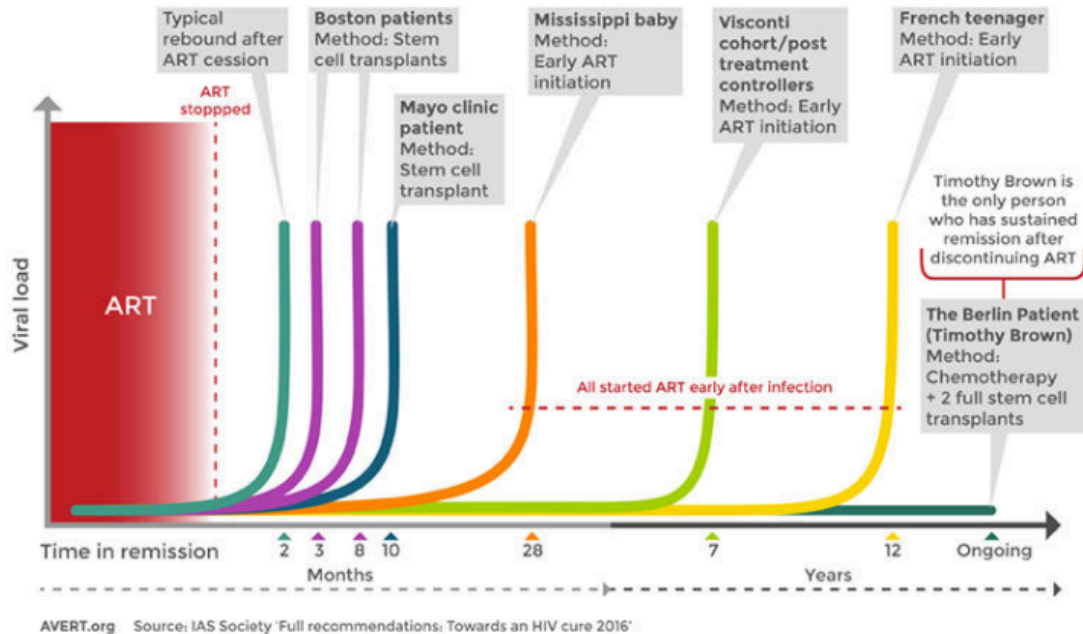


Figure 1.14. Temps de rémission et rebond viral dans le cadre de divers essais cliniques. Issu de <https://www.avert.org/professionals/hiv-science/searching-cure>

Plusieurs stratégies ont été proposées pour diminuer la taille des réservoirs viraux et/ou améliorer les fonctions du système immunitaire afin de contrôler le réservoir chez les individus infectés : les cellules T chimériques CARs (chimeric antigen receptors), stratégies vaccinales, anticorps neutralisants (broadly neutralizing antibodies *bNab*), immunothérapie via l'utilisation d'anticorps bloquant des molécules inhibitrices de points de contrôle, et la stratégie du « *Shock and Kill* » [271]. A l'opposé de la stratégie du *Shock and Kill*, la stratégie du *Block and Lock* vise à bloquer l'expression virale [272, 273].

Les anticorps neutralisants

La plupart des individus infectés par le VIH produisent des anticorps non neutralisants ou des anticorps qui neutralisent un nombre limité de souches virales. Environ 1% des individus infectés sont capables de produire de hauts titres d'anticorps neutralisants (*bNabs*, *broadly neutralizing antibodies*). Ces *bNabs* présentent un haut niveau d'hypermutations somatiques et reconnaissent plusieurs régions de l'enveloppe virale [274].

Certains de ces *bNabs* ont pu être produits à grande échelle afin d'évaluer leur potentiel thérapeutique. Ces *bNabs* présentent plusieurs avantages : Ils ont une longue durée de vie (environ 2 à 3 semaines), de telle sorte qu'une administration unique de ces anticorps chez les macaques peut les protéger de l'infection par le VIH pendant 23 semaines consécutives [275]. De plus, la durée de demi-vie de ces anticorps peut être augmentée en induisant des mutations dans la partie constante Fc. Les *bNabs* ont des cibles différentes de celles des ARVs, permettant aux

individus résistants aux bNabs de rester sensibles aux ARVs. Dans les modèles animaux, l'administration passive des bNabs est associée à la suppression virale, à une augmentation de l'élimination des cellules infectées, à une augmentation des réponses immunes antivirales, et à une réduction de la taille des réservoirs viraux [274]. De plus, l'administration précoce de bNabs dans un modèle de macaques SHIV (*simian/human immunodeficiency virus*) favorise le développement d'une immunité CD8 efficace associée à un contrôle de l'infection à long-terme [276].

Les premiers essais cliniques chez l'homme n'ont pas rapporté de toxicité. De plus, l'administration passive des bNabs accélère l'élimination des virions libres et des cellules infectées, et améliore l'immunité humorale [274]. Dans une étude clinique effectuée chez l'humain visant à étudier la capacité du VRC01 (bNaB qui neutralise 90% des souches du groupe M) à maintenir le contrôle de la virémie après interruption de ART, les auteurs ont montré que le rebond viral est légèrement retardé chez certains sujets [277]. Cependant, tout comme c'est le cas avec la thérapie antirétrovirale, l'administration d'un seul bNab est associée au phénomène de résistance, montrant la nécessité de combiner plusieurs bNabs pour le contrôle de la virémie. Une autre étude chez l'homme impliquant le bNab 3BNC117 a également observé un retard dans le rebond viral après interruption de ART comparativement aux contrôles historiques (moyenne de 10 semaines dans le groupe ayant reçu 4 infusions du bNab, versus 3 semaines pour les contrôles historiques) [278].

Les cellules T chimériques (CAR)

Cette technologie vise à améliorer l'immunité adaptative contre le VIH en infusant chez les individus infectés des cellules T qui ont été modifiées *in vitro* de manière à exprimer des récepteurs chimériques reconnaissant la protéine d'enveloppe virale [279]. Deux essais cliniques sont actuellement en cours chez l'humain (NCT 03240328 and NCT 01013415). Le fonctionnement de cette approche pour augmenter les réponses T spécifiques au VIH a été confirmé *in vitro*, ainsi que *in vivo* dans des modèles animaux [279]. Une nouvelle génération de cellules T CAR exprimant des anticorps neutralisants reconnaissant la protéine d'enveloppe a récemment été générée [280]. *In vitro*, cette nouvelle génération de cellules CAR est capable d'induire la lyse des cellules infectées et des cellules latentes réactivées. Des études complémentaires sont nécessaires pour répondre à des questions essentielles dans le domaine des CAR et de l'obtention d'une guérison fonctionnelle pour le VIH : 1) Ces cellules T CAR ciblant le VIH sont-elles capables de persister après infusion ? 2) Sont-elles capables d'accéder à tous les sanctuaires anatomiques dans lesquels le virus persiste ? 3) Peuvent-elles être infectées ? Dans le contexte de cette dernière question, une étude publiée en 2017 montre qu'il est possible de rendre les cellules T modifiées résistantes à l'infection par le VIH en introduisant la construction CAR dans le locus CCR5 [281].

Les stratégies vaccinales

Les stratégies vaccinales visent à augmenter les réponses CD4 et CD8 spécifiques du VIH pour permettre un meilleur contrôle de l'infection. Plusieurs études ont été effectuées chez des macaques infectés par le SIV, et nous renseignent sur la potentielle fonctionnalité de ces stratégies vaccinales chez l'humain. En 2006, Borducchi *et al* ont étudié l'impact de la vaccination thérapeutique Ad26/MVA (*adenovector 26/Modified vaccinia virus ankara*) en combinaison avec la stimulation TLR-7 sur le contrôle de la virémie après interruption de ART [282]. Bien que la vaccination soit associée à une diminution de l'ADN viral dans le sang périphérique et les ganglions lymphatiques, à une augmentation des réponses CD4 et CD8 spécifiques du VIH ainsi qu'au développement de cellules T spécifiques ciblant plus de 50 épitopes viraux, un rebond viral a été observé chez tous les singes après interruption du traitement. Néanmoins un délai dans le rebond viral de 2,5X a été observé dans le groupe ad26/MVA+TLR-7 comparativement au groupe contrôle. Une étude publiée en 2018 a rapporté les résultats d'un essai clinique de phase 1 visant à évaluer la toxicité de l'administration orale d'un vaccin atténué ad26 chez les individus non infectés ainsi que sa capacité à améliorer les réponses immunitaires [283]. Bien que ce vaccin ait été relativement bien toléré, une dose unique de ce vecteur était peu immunogénique, indiquant la nécessité d'utiliser des vecteurs viraux moins atténués dans les études futures. En parallèle, un autre essai clinique évaluant l'efficacité d'un vaccin mosaïque ad26 (vecteur exprimant divers antigènes du VIH : Gag/Pol/Env) a été effectué [284]. D'importants effets immunogéniques ont été constatés lorsque ce vaccin est combiné à un adjuvant gp140, à la fois chez l'humain et chez les singes, et cette stratégie vaccinale est actuellement à l'essai en phase 2b.

L'immunothérapie via l'utilisation d'anticorps bloquant des molécules inhibitrices de points de contrôle

L'infection par le VIH se caractérise par un épuisement des cellules immunitaires associé à une augmentation de l'expression des molécules de co-inhibition à la surface cellulaire [285]. Plusieurs études ont montré que l'utilisation d'anticorps bloquant ces molécules de co-inhibition permettent d'améliorer les fonctions des cellules T CD4 et CD8 dans le cadre de l'infection par le VIH [286, 287]. De plus, les cellules exprimant PD-1 et TIGIT sont enrichies en ADN viral et en virus compétent pour la traduction protéique chez les individus sous ART [288, 289]. Une étude récemment publiée par notre laboratoire montre que les molécules co-inhibitrices promeuvent la latence virale en envoyant des signaux inhibiteurs dans les cellules T infectées [290]. En effet, le blocage du récepteur PD-1 à la surface de ces cellules favorise la réactivation du VIH induite par des agents anti-latence [290]. Par conséquent, le blocage des molécules de co-inhibition favoriserait non seulement la réactivation du VIH mais également une meilleure élimination des réservoirs viraux en augmentant les fonctions des cellules T. Une revue systématique de la littérature publiée en 2019 a identifié 73 patients VIH+ ayant reçu une immunothérapie pour le

traitement de leur cancer (anti-PD1 : 62, anti-CTLA-4 : 6, anti-PD-1/CTLA-4 : 4, traitement séquentiel anti-CTLA4 + anti-PD-1 : 1) [291]. Cette étude conclut que l'immunothérapie visant à bloquer les molécules co-inhibitrices de points de contrôle peut être utilisée dans cette population d'individus infectés par le VIH sans risques majeurs de toxicité. De façon intéressante, une augmentation du compte CD4 est observée après traitement [291]. Fromentin *et al* ont également observé une diminution progressive des niveaux d'ADN viral et d'ARN associé aux cellules chez un individu recevant un anticorps anti-PD-1 pour le traitement d'un mélanome métastatique [290]. A l'opposé, Evans *et al* ont observé une augmentation de l'ARN associé aux cellules en l'absence d'une modification des niveaux d'ADN viral chez un individu sous ART recevant la thérapie anti-PD-1 pour le traitement d'un mélanome métastatique [292]. Il est possible que cette observation reflète la capacité des anticorps anti-PD-1 à réactiver le virus de sa latence. L'absence de mesures longitudinales sur une plus longue période de temps ne permet pas de déterminer si cette thérapie est associée à une diminution subséquente et progressive des niveaux d'ADN et d'ARN associé aux cellules chez cet individu.

La stratégie du Shock and Kill

Le principe de cette stratégie vise à forcer la réactivation des provirus latents tout en maintenant ART pour empêcher de nouveaux cycles de réplication virale. La réactivation du virus favoriserait l'élimination des réservoirs cellulaires du VIH via les effets cytopathiques du virus et la reconnaissance des cellules infectées par le système immunitaire (Figure 1.15). Une étude publiée en 2014 montre qu'une réduction des réservoirs de >4 logs serait nécessaire pour atteindre une rémission chez 50% des individus [293]. Cette observation souligne l'importance d'utiliser des agents anti-latence (latency reversing agents, LRAs) qui ont un fort pouvoir de réactivation, tout en ayant pas/peu d'effets secondaires *in vivo*. Il est également important que ces agents n'induisent pas une activation cellulaire globale, puisque cette activation peut induire un syndrome de tempête cytokinique extrêmement toxique. En effet, dans une étude clinique réalisée en 1999 et visant à réactiver le virus latent en traitant les participants avec la combinaison anti-CD3/IL-2, de nombreux effets secondaires induits par l'activation/prolifération cellulaire ont été observés (fièvre, nausée, diarrhée, maux de tête, insuffisance rénale) [294].

Plusieurs classes de LRAs, ciblant divers facteurs impliqués dans la latence du VIH, ont été testées *in vitro*, *ex vivo* et *in vivo* pour leur capacité à réactiver le VIH de sa latence (Figure 1.10): les inhibiteurs d'histones desacétylases (HDACi : vorinostat, panobinostat, romidepsine...), les agonistes de protéine kinase C (PKC) qui agissent sur l'activation de la voie NF-kB (bryostatine, prostratine, ingénol...), et les agonistes de la voie P-TEFb (HMBA, I-BET, JQ-1...) [238, 295, 296, 297, 298-308]. Ces agents anti-latence ciblent des mécanismes impliqués dans un grand nombre de processus cellulaires et sont donc non spécifiques à l'induction transcriptionnelle du VIH, ce qui est associé à un risque accru de toxicité et d'effets secondaires

(discuté dans [309]). Par ailleurs, ces agents pourraient induire la réactivation d'autres virus latents, tels que le CMV, l'EBV et potentiellement des rétrovirus endogènes. Dans le cadre d'essais cliniques pour le traitement de divers cancers, plusieurs effets secondaires importants ont été rapportés suite à l'utilisation de l'agoniste de PKC bryostatine [310-313]. Ces études soulignent la toxicité potentielle de ces agents et la nécessité d'utiliser des doses relativement faibles.

Plus récemment, les mimétiques de Smac ont été proposés dans le cadre de la stratégie du *Shock and Kill*. Smac est une protéine endogène qui antagonise la protéine IAP (*Inhibitor of Apoptosis Protein*). Les mimétiques de Smac se lient à IAP, induisant son auto-ubiquitinylation et sa dégradation par le protéasome, ce qui permet l'accumulation de NIK (*NF- κ B-inducing kinase*) et l'activation de la voie non canonique de NF- κ B (ncNF- κ B)[314]. Contrairement à la voie canonique de NF- κ B, l'activation de la voie ncNF- κ B a peu d'effet sur l'activation globale des cellules T CD4+ et altère l'expression d'un nombre restreint de gènes [315], limitant le risque de toxicité et d'effets secondaires. En 2015, la protéine IAP a été identifiée comme régulateur négatif de la transcription du VIH et comme cible potentielle pour la réactivation virale [316]. Dans cette même étude, les auteurs ont montré que le panobinostat synergise avec un mimétique de Smac (SBI-0637142) pour induire la réactivation virale dans des lignées cellulaires *in vitro* mais également dans des cellules T CD4+ isolées d'individus vivant avec le VIH sous ART [316]. Plus récemment, il a été montré que le mimétique de Smac AZD5582 augmente l'expression de l'ARN viral associé aux cellules dans les lymphocytes T CD4+ isolés d'individus infectés par le VIH sous ART [315], mais également *in vivo* dans les lymphocytes T CD4+ des ganglions lymphatiques de macaques SIV+ sous ART traités par l'AZD5582 [317]. Enfin, il a été montré que le mimétique de Smac Birinapant augmente l'expression de la caspase 3, favorisant l'apoptose des cellules [318]. Cette observation suggère que les mimétiques de Smac pourraient non seulement agir sur la réactivation virale (« Shock ») mais pourraient également favoriser la diminution de la taille du réservoir viral (« Kill »), tout en étant relativement peu toxiques comparativement aux agonistes de PKC.

La plupart des agents mentionnés sont déjà utilisés en clinique dans le cadre du traitement des cancers et d'autres maladies, facilitant la mise en place d'essais cliniques pour le développement de stratégies anti-latence. La majorité des essais cliniques visant à tester la capacité des agents anti-latence à réactiver l'expression virale impliquent des inhibiteurs d'histones désacétylases, tels que l'acide valproïque (VPA) [319-323], le vorinostat [324-326], le panobinostat [327] et la romidepsine [328]. L'agoniste de PKC bryostatine a été récemment testé dans un essai clinique de phase I chez des individus VIH+ sous ART [329]. Bien que la bryostatine ait été relativement bien tolérée, les faibles doses testées n'ont pas eu d'effet sur l'activité pharmacologique de la PKC ni sur la réactivation de la transcription virale [329]. Des études cliniques complémentaires devraient permettre de déterminer si des doses plus élevées

d'agonistes de PKC permettent de réactiver l'expression virale en l'absence de toxicité. De plus, l'application cutanée d'ingénol mébutate pour le traitement de la kératose actinique induit la réactivation locale du VIH au niveau de la peau en absence d'activation systémique [330]. Bien que les divers agents anti-latence réactivent le VIH *in vitro*, *ex vivo*, et induisent une augmentation de l'ARN du VIH (ARN associé aux cellules, ou ARN associé aux particules virales dans le plasma) *in vivo* chez des participants sous ART, aucune diminution de la taille des réservoirs viraux n'a pu être observée dans ces études cliniques [331].

Plusieurs facteurs peuvent être responsables de cette incapacité à diminuer la taille des réservoirs viraux *in vivo* [332]. Il est possible que ces agents ne soient pas assez puissants pour induire des niveaux de réactivation suffisants pour permettre l'élimination des cellules infectées. Dans ce contexte, plusieurs études *in vitro* et *ex vivo* ont montré que les combinaisons d'agents anti-latence induisent des niveaux de réactivation plus élevés que les agents seuls [301, 305, 306, 307, 308]. Bien que plusieurs combinaisons aient déjà été testées dans des essais cliniques de thérapie anti-cancer [333], aucune combinaison n'a été testée *in vivo* chez des individus sous ART. Une meilleure compréhension de la capacité de ces combinaisons à réactiver le VIH *ex vivo* dans les différentes sous-populations de lymphocytes T CD4+ qui servent de principaux réservoirs est requise pour le développement d'essais cliniques impliquant ces combinaisons. Ce sujet a d'ailleurs fait l'objet d'une partie de mes travaux au cours de ma thèse, et les résultats obtenus sont présentés dans l'article 2 (chapitre 3).

Une mauvaise élimination (« *Kill* ») des cellules infectées de manière latente peut également être impliquée dans cette absence de diminution de la taille des réservoirs du VIH après réactivation virale, et ce pour plusieurs raisons. D'une part, l'infection par le VIH est associée à l'épuisement des cellules T CD8+, qui se définit par une diminution progressive des capacités de production cytokinique, de prolifération et de cytotoxicité, ainsi que par une augmentation de l'expression de molécules inhibitrices de point de contrôle (PD-1, TIGIT, CD160, 2B4, Tim3, LAG-3) [334]. Il est à noter que l'initiation de ART ne restaure que partiellement les niveaux de ces molécules à la surface des cellules T CD8+ [335, 336]. Par conséquent, le phénomène d'épuisement des cellules T CD8+ pourrait participer au défaut d'élimination des réservoirs viraux dans le contexte de la stratégie du « *Shock and Kill* ». De plus, le nombre de cellules T CD8+ spécifiques du VIH diminue de façon drastique après initiation du traitement [337, 338]. Le manque de cellules T CD8+ après une période prolongée sous ART pourrait également avoir un impact négatif sur l'élimination des réservoirs cellulaires du VIH. Par ailleurs, il a été montré que plusieurs agents anti-latence ont un effet inhibiteur sur l'activité cytotoxique des lymphocytes T CD8+ et des cellules NK [339]. C'est le cas de la romidepsine (HDACi) qui inhibe la fonction des cellules T CD8+ [340], et de la bryostatine qui inhibe l'activité des cellules NK [341]. Enfin, certains provirus défectifs peuvent être transcrits [214] et traduits en protéines virales, qui peuvent être reconnues par les cellules T CD8+ spécifiques du VIH [213]. Puisque les cellules

infectées contenant des virus défectifs représentent 98% des réservoirs totaux [215], la reconnaissance de ces réservoirs défectifs pourrait limiter l'élimination des réservoirs contenant les provirus compétents pour la réplication. Ce problème a d'ailleurs été illustré récemment dans une étude menée par Huang *et al*, dans laquelle la fréquence de cellules contenant de l'ADN viral était diminuée en absence d'une réduction de la taille des réservoirs viraux compétents pour la réplication [342]. En effet, des mutations dans certains gènes du VIH pourraient favoriser la reconnaissance des réservoirs défectifs par les cellules T CD8+. C'est le cas des mutations dans le gène codant pour la protéine Nef, connue pour induire une diminution de l'expression du MHC-I. Par conséquent, les mutations du gène *nef* pourraient augmenter la reconnaissance de ces réservoirs défectifs par les cellules T CD8+.

Toutes ces observations démontrent l'importance d'améliorer non seulement le « *shock* » en utilisant des combinaisons efficaces d'agents anti-latence, mais également d'agir sur le « *kill* » en développant des stratégies qui favorisent la prolifération et la fonction des cellules cytotoxiques spécifiques du VIH.

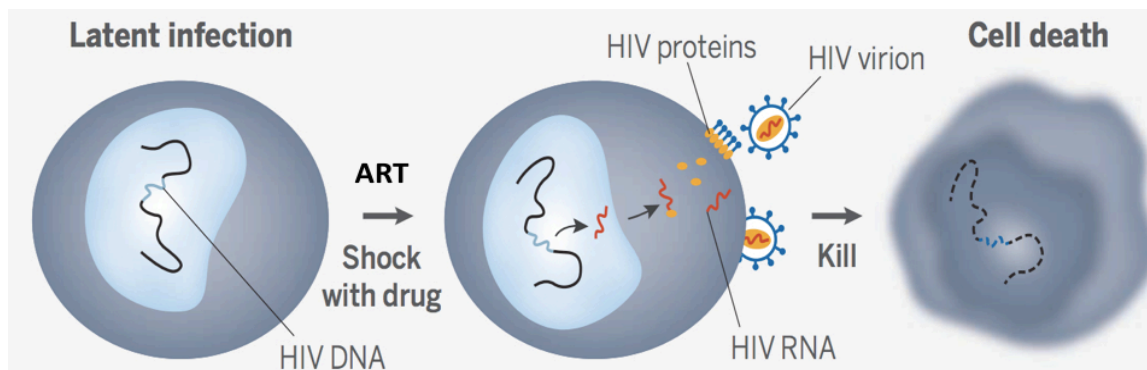


Figure 1.15. Stratégie du « Shock and Kill ». Le principe de cette stratégie vise à forcer la réactivation des provirus latents tout en maintenant ART pour empêcher de nouveaux cycles de réplication virale. La réactivation du virus favoriserait l'élimination des réservoirs cellulaires du VIH via les effets cytopathiques du virus et la reconnaissance par le système immunitaire. Issu de <https://www.kqed.org/futureofyou/64080/a-cure-for-aids-scientists-say-its-on-the-horizon>

La stratégie du Block and Lock

Cette stratégie vise à utiliser des agents pro-latence (*latency-promoting agents, LPAs*) pour bloquer la réactivation sporadique du virus latent. En renforçant la latence virale et la rendant irréversible, il serait envisageable d'arrêter le traitement sans crainte de rebond de la charge virale plasmatique.

Ces agents pro-latence peuvent agir à différents niveaux : 1) En inhibant des protéines virales (*e.g. Trans-Activator of Transcription, Tat*) ou cellulaires (*e.g. splicing factor 3B subunit 1, SF3B1*) jouant un rôle important dans la transcription du génome proviral (initiation, élongation, épissage) [272, 273, 343], 2) En inhibant des voies de signalisation cellulaires impliquées dans la réactivation du VIH (*e.g. NF-kB, Jak, mTOR*) [344], et/ou 3) En ciblant des enzymes épigénétiques qui modifient l'état de condensation de la chromatine au niveau du promoteur viral (*e.g. H3K27 déméthylase UTX-1 et H3K36Me3 déméthylase MINA53*) [228, 345]. Le LPA le plus étudié et caractérisé porte le nom de didehydro-cortistatine A (dCA), un inhibiteur de Tat [272, 273]. Dans des cultures cellulaires de lymphocytes T CD4⁺ isolés d'individus vivant avec le VIH sous ART, le dCA inhibe le rebond viral après interruption du traitement, et ce même lorsque les cellules sont exposées à un agoniste de PKC (prostratine) [273]. Dans un modèle de souris humanisées infectées par le VIH et sous ART, l'administration du dCA est associée à une diminution de l'ARN viral dans les tissus et retarde le rebond viral après interruption du traitement comparativement aux souris contrôles [273]. Enfin, en réduisant l'activité transcriptionnelle du VIH, le dCA pourrait également diminuer l'activation immune chronique qui est associée au phénomène de vieillissement accéléré du système immunitaire [346].

6. Méthodes de mesure de la taille des réservoirs viraux

La mise en place de stratégies thérapeutiques visant à diminuer la taille des réservoirs viraux requiert le développement d'essais fiables et précis pour mesurer la capacité de ces stratégies à réduire les réservoirs du VIH. Plusieurs méthodes présentant divers niveaux de sensibilité et de spécificité sont utilisées pour mesurer la taille des réservoirs viraux chez les individus sous thérapie antirétrovirale (Figure 1.16).

La fréquence de cellules infectées par le VIH peut être déterminée par des méthodes de PCR spécifiques de l'ADN viral (ADN total, ADN intégré, ou les formes non intégrées 2 LTRs). Bien que ces méthodes soient les plus rapides et les plus faciles à mettre en œuvre, elles surestiment la taille des réservoirs viraux. En effet, ces approches amplifient à la fois les génomes intacts, mais également les génomes défectifs qui représentent 98% de la population provirale chez les individus infectés et traités en phase chronique d'infection [215].

Le QVOA (*Quantitative Viral Outgrowth Assay*) est souvent considéré comme « *gold standard* » pour mesurer la taille des réservoirs viraux [63, 65, 66, 347]. Cette méthode est fondée sur le principe de dilutions limites et permet de mesurer la fréquence de cellules T CD4+ contenant des virus compétents pour la réplication. Dans cet essai, les cellules T CD4+ sont activées, favorisant la réactivation des provirus latents et la production de particules virales infectieuses. Les virus compétents pour la réplication propagent ensuite l'infection. Plusieurs types de cellules *feeders* peuvent être utilisés pour amplifier cette étape de propagation infectieuse (lymphoblastes CD4+ activés issus de donneurs non infectés, ou des lignées cellulaires MOLT4/CCR5 ou SupT1-CCR5). Après 2 ou 3 semaines, les niveaux de protéine virale p24 ou d'ARN viral sont mesurés dans le surnageant de culture par ELISA ou PCR, respectivement. Contrairement aux essais PCR reconnaissant l'ADN viral, le QVOA sous-estime généralement la taille du réservoir viral [348, 349]. Cette sous-estimation peut être la conséquence d'une réactivation virale sous-optimale, puisqu'il a été montré qu'un seul cycle de réactivation n'est pas suffisant pour induire la réactivation de tous les provirus [349]. Par ailleurs, il est également possible que la propagation de l'infection ne soit pas adéquate après réactivation en co-culture. Enfin, le QVOA est coûteux, laborieux, requiert un très grand nombre de cellules et il existe un manque de standardisation de la méthode ce qui la rend difficile à reproduire. Le manque de reproductibilité et de standardisation a récemment été rapporté dans une étude visant à comparer les mesures de QVOA obtenues dans 5 laboratoires différents sur les mêmes échantillons cellulaires [350]. Des différences de 24 fois ont été observées entre les différentes mesures de QVOA, probablement suite à l'utilisation de protocoles relativement différents entre laboratoires.

Plusieurs méthodes quantifiant l'ARN viral ont également été proposées pour mesurer la taille des réservoirs viraux inductibles chez les individus sous ART [351, 352]. Dans ces essais, l'ARN des virions dans le surnageant (cell-free RNA, cf-RNA) ou l'ARN des extraits cellulaires (cell-associated RNA, ca-RNA) est quantifié par PCR ultrasensible après réactivation virale [CD3/CD28, *phorbol 12-myristate 13-acetate* (PMA)/ionomycin, LRAs]. Certains de ces essais utilisent le principe de dilutions limites, ce qui permet de déterminer la fréquence de cellules infectées capables de produire des ARNs viraux après réactivation [353, 354]. L'activation de la population globale de cellules T CD4+ en absence de dilutions limites permet de mesurer le nombre de copies d'ARN viral après réactivation, mais ne permet pas de mesurer une fréquence de cellules infectées. Il est à noter que ces méthodes surestiment également la taille des réservoirs viraux puisque certains provirus défectifs sont capables de produire des ARNs viraux tout en étant non-compétents pour la réplication. Néanmoins, ces essais présentent l'avantage

de ne pas nécessiter de co-culture et d'étape de propagation virale, et sont donc plus rapides et moins limitants que le QVOA.

Plusieurs types d'ARNs peuvent être ciblés par ces méthodes PCR : les ARNs non épissés (unspliced RNA, *usRNA*), multi-épissés (multi-spliced RNA, *msRNA*), les transcrits matures présentant une queue polyA, les ARNs TAR (qui reflètent l'initiation de la transcription), et les « *readthrough* » chimériques hôte-VIH. Ces *readthrough* chimériques sont générés lorsque le provirus s'intègre dans des régions transcriptionnellement actives du génome de l'hôte, et qu'il est transcrit à partir de promoteurs cellulaires (phénomène d'interférence transcriptionnelle) [24]. Par conséquent, au contraire des *usRNAs*, les *readthrough* chimériques contiennent la région U3 du LTR 5' du VIH (région précédant le site d'initiation de la transcription du génome viral) [355]. Les essais ciblant divers ARNs viraux nous donnent des informations importantes sur la capacité des agents anti-latence à surmonter les blocs viraux qui peuvent avoir lieu à plusieurs étapes de la transcription (initiation, élongation, épissage, terminaison). Ceci est illustré par une étude clinique récente dans laquelle 17 individus infectés par le VIH ont reçu plusieurs infusions d'un HDACi, la romidepsine. Dans cet essai, la romidepsine induisait l'initiation et l'élongation des transcrits viraux, mais avait peu d'effets sur les étapes tardives de la transcription (épissage et terminaison) [356]. Par ailleurs, les essais ciblant plusieurs types d'ARN viraux peuvent également être utilisés en absence de réactivation pour analyser le profil transcriptionnel des cellules infectées. En effet, les cellules T CD4+ contenant des génomes viraux peuvent produire de faibles niveaux de transcrits viraux [214] et éventuellement de protéines [213] chez des individus sous ART (concept de « *leaky latency* »). Une étude effectuée par Yukl *et al.* a récemment montré que, dans les cellules non stimulées, les blocs transcriptionnels surviennent essentiellement au niveau des étapes d'élongation, maturation des transcrits, et d'épissage [357].

Parmi les essais mesurant les ARNs viraux, le *Tat/rev Induced Limiting Dilution Assay* (*TILDA*) est une méthode qui se base sur le principe de dilutions limites et qui permet de mesurer la fréquence des cellules infectées produisant des ARNs multi-épissés [358]. Cet essai a été utilisé au cours de mon travail de doctorat pour caractériser les mécanismes de persistance virale dans les ganglions lymphatiques d'individus vivant avec le VIH et sous ART (voir article 3, chapitre 4). Comme mentionné précédemment, le virus peut persister sous ART grâce à deux mécanismes principaux : production active à bas bruit et/ou latence. Le *TILDA* présente l'avantage de permettre l'étude des contributions relatives de ces deux mécanismes dans divers tissus. En effet, en absence de réactivation, cet essai nous renseigne sur la fréquence de cellules contenant des provirus transcriptionnellement actifs. D'autre part, suite à la réactivation par la PMA/ionomycine, il est possible de mesurer la fréquence de cellules infectées de manière latente. Enfin, le *TILDA*

présente de nombreux avantages. C'est un essai robuste et sensible, qui nécessite seulement 10mL de sang (740.000 cellules CD4 permettent d'avoir une limite de détection de 1.4 cellules exprimant des msRNAs/million de cellules T CD4+) et qui peut être réalisé en seulement 2 jours.

La cytométrie en flux peut également être utilisée pour mettre en évidence les cellules réservoirs contenant des virus compétents pour la traduction protéique. Néanmoins, les anticorps détectant la protéine de capsid p24 par cytométrie en flux sont souvent peu spécifiques [359-361]. Par conséquent, la détection de cellules p24+ dans des échantillons cliniques ne correspond pas toujours à des cellules infectées. Ce manque de spécificité est illustré par la détection de cellules p24+ dans des échantillons cliniques d'individus non infectés par le VIH [289]. Par ailleurs, Graf *et al.* ont montré que les cellules p24+ ne sont pas toutes enrichies en ADN du VIH (0.13 copies d'ADN viral/cellule), tandis que les cellules exprimant de hauts niveaux de p24 sont hautement enrichies en ADN du VIH (1.1 copie d'ADN viral/cellule) [362]. Le développement d'approches qui permettent la détection simultanée de transcrits du VIH et de la protéine de capsid p24 par cytométrie en flux (*mRNA Flow-FISH*) ont permis d'améliorer la spécificité de ces techniques [363-365]. Puisqu'il est probable que certains virus défectifs soient capables de produire la protéine p24 malgré leur incapacité à se répliquer en culture, ces approches peuvent également surestimer la taille des réservoirs viraux. Néanmoins, ces essais fournissent une mesure plus précise de la taille des réservoirs viraux que les méthodes de PCRs ADN ou ARN. Un avantage majeur de la technique de mRNA Flow-FISH réside dans sa capacité à obtenir le phénotype des cellules réservoirs par cytométrie en flux (discuté dans le point 6). Néanmoins, cette méthode est coûteuse, laborieuse, requiert de grandes quantités de cellules (10-20x10⁶ de cellules CD4+) en raison d'une perte de matériel importante au cours des nombreuses étapes de lavages. Par ailleurs, cette méthode requiert l'utilisation de sondes qui doivent s'hybrider de façon optimale aux transcrits ARN. Afin de remédier à ces inconvénients, nous avons proposé un essai alternatif de cytométrie en flux qui permet la détection simultanée de plusieurs épitopes de la protéine p24 (*HIV-Flow*). Le principe de cette méthode ainsi que les résultats obtenus font l'objet de l'article 1 de ce travail (chapitre 2) [289].

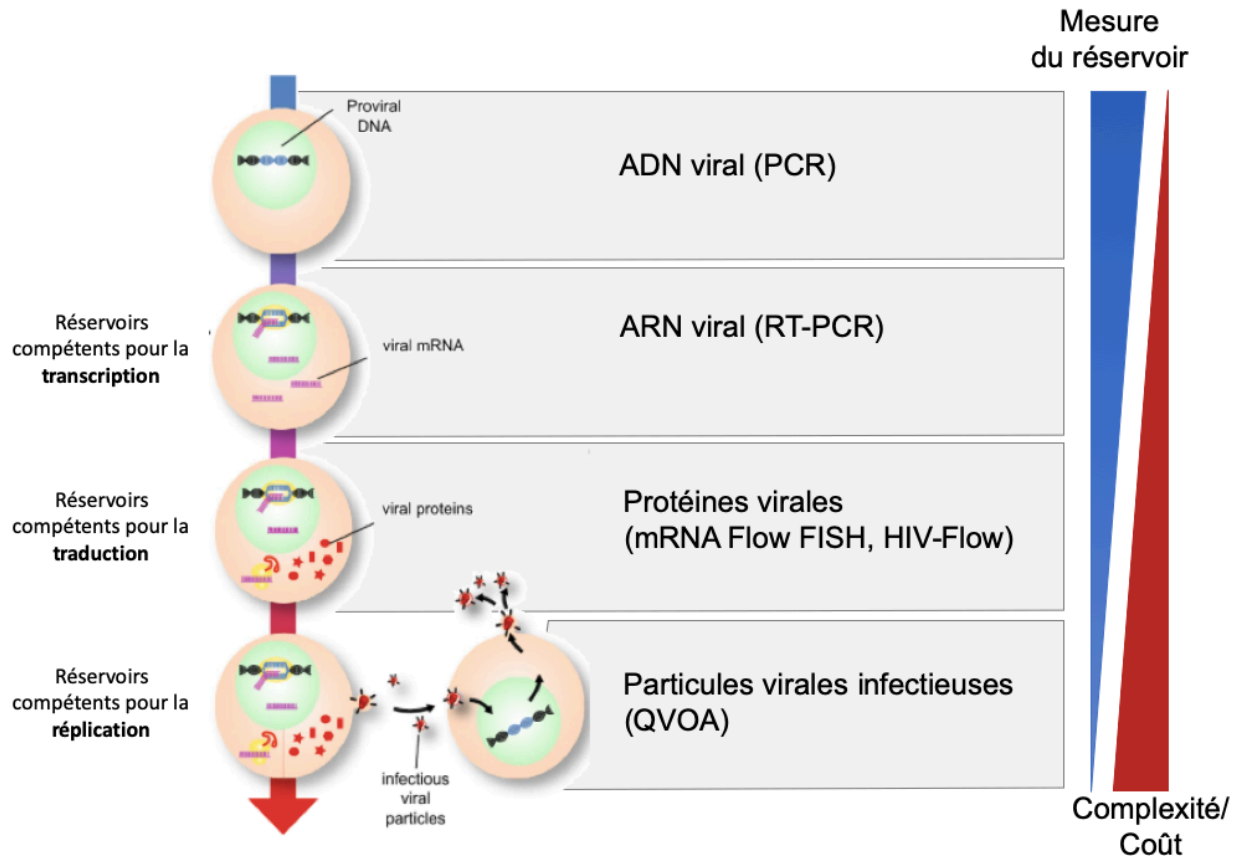


Figure 1.16. Méthodes permettant de mesurer la taille des réservoirs viraux. Les essais de PCR reconnaissant l'ADN viral surestiment la taille des réservoirs viraux puisqu'ils reconnaissent à la fois les génomes intacts et les génomes défectifs. D'autres essais permettent de mesurer la taille des réservoirs viraux capables de produire des ARNs viraux après réactivation. Le mRNA Flow FISH ainsi que le HIV-Flow sont des essais de cytométrie en flux permettant de déterminer la fréquence de cellules infectées contenant des virus compétents pour la traduction protéique. Enfin, le QVOA est considéré comme le « *gold standard* » et permet de mesurer la taille des réservoirs viraux compétents pour la réplication. *Adapté de (Baxter AE et al, Retrovirology, 2018)*

7. Phénotyper les cellules réservoirs

Une meilleure compréhension du phénotype des cellules réservoirs semble essentielle au développement de stratégies thérapeutiques ciblant les réservoirs viraux. Plusieurs molécules ont été identifiées comme étant préférentiellement exprimées par les cellules infectées de manière latente chez les individus sous thérapie antirétrovirale. La majorité de ces molécules ont été identifiées en mesurant l'ADN du VIH dans des populations purifiées de cellules exprimant divers niveaux de ces molécules. Bien que cette méthode permette d'identifier de nouveaux marqueurs d'enrichissement pour le VIH, elle présente plusieurs inconvénients : nécessité de purifier les populations par cytométrie en flux ce qui est associé à un coût élevé, mesure de l'ADN du VIH par PCR qui reconnaît à la fois les génomes défectifs et intacts. Le développement de méthodes

permettant de détecter les cellules capables de produire des transcrits viraux et/ou des protéines virales par cytométrie en flux (mRNA Flow-FISH, HIV-Flow) ont facilité l'identification de populations cellulaires spécifiques qui sont préférentiellement enrichies en cellules infectées par le VIH [289, 363 , 365].

Bien que CD32a ait récemment été proposé comme marqueur exprimé spécifiquement par les cellules infectées de manière latente [366], plusieurs études ont récemment remis en question cette observation [365, 367-371, 372]. Au contraire, les résultats suggèrent que les réservoirs cellulaires sont phénotypiquement distincts, et qu'il est peu probable qu'une seule molécule identifie de façon spécifique la totalité des cellules infectées. Par conséquent, cette observation complique le développement de stratégies thérapeutiques. Les méthodes combinant la purification de populations cellulaires spécifiques par cytométrie en flux et la mesure de l'ADN/ARN viral par PCR ont permis d'identifier plusieurs marqueurs préférentiellement exprimés par les cellules infectées, incluant CD30, CD2, PD-1, LAG-3, TIGIT et CTLA-4 [288, 373 , 374 , 375].

La molécule CD30 fait partie de la superfamille des récepteurs au TNF, et est exprimée par un très faible pourcentage des lymphocytes T chez les individus sains. Des niveaux élevés de CD30 soluble sont associés à une rapide progression de la maladie chez les individus infectés par le VIH et non traités [376]. De plus, la stimulation de CD30 est associée à l'activation de la voie NF- κ B [377] et augmente l'expression du VIH-1 *ex vivo* [378]. Plus récemment, il a également été montré que l'expression de CD30 à la surface des lymphocytes T CD4+ est augmentée dans le cadre de l'infection par le VIH comparativement aux sujets non infectés, et que ces niveaux d'expression ne sont pas restaurés par la thérapie antirétrovirale [375]. De plus, chez les individus sous ART, les cellules CD4+ exprimant CD30 sont enrichies en ARN du VIH associé aux cellules [375], suggérant que cette molécule pourrait être un marqueur de cellules contenant des provirus transcriptionnellement actifs.

CD2 est une molécule d'adhérence cellulaire trouvée à la surface des lymphocytes T et des cellule NK. CD2 agit également comme molécule de co-stimulation à la surface de ces cellules [379]. La molécule CD2 a été identifiée comme étant préférentiellement exprimée par les cellules infectées de manière latente dans le cadre d'une étude visant à comparer le profil transcriptionnel des cellules infectées de manière latente avec celui des cellules non infectées dans un modèle de latence *in vitro* [373]. Les auteurs ont ensuite montré que les cellules T CD4+ exprimant de hauts niveaux de CD2 sont enrichies en ADN du VIH comparativement aux cellules exprimant des bas niveaux de cette molécule, confirmant le potentiel rôle de cette molécule comme marqueur d'enrichissement. De plus, suite à une stimulation TCR de 6 jours, une importante

production de particules virales a été détectée dans le surnageant des cellules T CD4+CD2^{high} alors que cette production était faible ou inexistante dans le surnageant des cellules T CD4+CD2^{low}. Cette observation suggère que les cellules exprimant de hauts niveaux de CD2 sont enrichies en génomes viraux intacts capables de produire des particules virales.

PD-1, LAG-3, TIGIT et CTLA-4 sont des inhibiteurs de point de contrôle exprimés à la surface des cellules T. L'expression de ces molécules est augmentée suite à l'activation cellulaire, et jouent un rôle important pour limiter l'hyperactivation du système immunitaire [380]. Ces molécules sont exprimées à haut niveau à la surface des cellules épuisées, dans le cadre du cancer et des infections chroniques, incluant le VIH [285]. Dans une étude publiée en 2016 par notre laboratoire, Fromentin *et al* ont montré que les cellules T CD4+ exprimant de hauts niveaux de PD-1, TIGIT et LAG-3 sont enrichies en ADN du VIH comparativement aux cellules exprimant de faibles niveaux de ces molécules. De plus, la co-expression de PD-1, LAG-3 et TIGIT à la surface des cellules augmente le degré d'enrichissement en ADN viral [288]. Par ailleurs, Banga *et al* ont montré que, chez des individus qui ont été traités pour une médiane de temps de 5 ans, les cellules PD-1+ des ganglions lymphatiques sont enrichies en ARN du VIH associé aux cellules comparativement aux autres sous-populations étudiées [88]. Enfin, dans un modèle de macaques infectés par le SIV et sous thérapie antirétrovirale, les cellules CTLA4+PD-1-, localisées à l'extérieur des follicules B des ganglions lymphatiques, sont enrichies en ADN du SIV et contiennent de hauts niveaux de virus compétents pour la réplication [374]. De plus, la contribution de cette population cellulaire à la persistance virale augmente avec le temps sous traitement. Cet enrichissement en ADN dans les cellules CTLA4+PD-1- a également été observé chez des individus infectés par le VIH et sous ART [374]. Une étude publiée récemment par notre laboratoire fournit une explication pour cet enrichissement en VIH dans les cellules qui expriment de hauts niveaux de corécepteurs inhibiteurs : le blocage du corécepteur PD-1 favorise la réactivation du VIH, suggérant que cette molécule joue un rôle important dans l'inhibition de l'expression virale [290]. Par conséquent, l'expression de ces corécepteurs inhibiteurs à la surface cellulaire favoriserait la latence du VIH.

Objectifs de la thèse

Cette thèse s'articule en 3 parties qui visent à mieux comprendre le phénomène de persistance virale, qui constitue un obstacle majeur à l'éradication du VIH et à la mise en place de stratégies thérapeutiques visant à la guérison des personnes vivant avec le VIH. Toutes nos études ont été effectuées sur des cellules de participants *ex vivo*, permettant de récapituler plus efficacement la complexité physiologique du phénomène de persistance virale *in vivo*.

Dans la première partie, nous avons développé une méthode de cytométrie en flux (HIV-Flow) permettant de détecter et de caractériser à l'échelle individuelle les cellules contenant un virus compétent pour la traduction protéique. Ce protocole simple et rapide qui nécessite relativement peu de cellules (5-10 millions de lymphocytes T CD4) facilite grandement l'étude du phénotype des cellules réservoirs. Grâce à cette méthode nous avons identifié plusieurs nouveaux marqueurs cellulaires de surface qui enrichissent en cellules réservoirs chez les personnes sous ART. De plus, cette méthode est associée à un grand nombre de perspectives d'études qui permettront de répondre à toute une série de questions essentielles dans le contexte de la persistance virale. Ces perspectives sont abordées dans la discussion.

Dans la seconde partie, nous avons étudié les mécanismes moléculaires de la latence virale dans les différentes sous-populations dans lesquelles le virus persiste, à savoir les cellules T CD4⁺ centrales mémoires (T_{CM}), transitionnelles mémoires (T_{TM}) et effectrices mémoires (T_{EM}). Via l'élaboration de protocoles de cytométrie en flux permettant d'étudier l'expression de divers facteurs impliqués dans l'expression virale, nous avons montré l'hétérogénéité de ces sous-populations en termes d'expression de ces facteurs mais également dans leur réponse pharmacologique induite par les agents anti-latence. Nous avons également utilisé le HIV-Flow pour étudier la capacité des agents anti-latence à réactiver le virus dans ces différentes sous-populations.

Dans la troisième et dernière partie, nous avons étudié le phénomène de persistance virale dans les ganglions lymphatiques d'individus sous ART. En effet, plusieurs études ont montré le rôle des ganglions lymphatiques dans la persistance à long terme du VIH, mais les mécanismes virologiques de persistance ont été peu étudiés dans ce compartiment anatomique. Grâce au TILDA, qui permet de mesurer la fréquence de cellules produisant des ARNs multi-épissés *tat/rev*, nous avons étudié les contributions de la latence et de la transcription résiduelle dans les ganglions lymphatiques. Enfin, nous avons utilisé le HIV-Flow pour étudier la production résiduelle active dans ce tissu chez les individus sous ART.

Chapitre 2 : Caractérisation et quantification des réservoirs viraux compétents pour la traduction chez des individus infectés traités ou non à l'échelle de la cellule individuelle

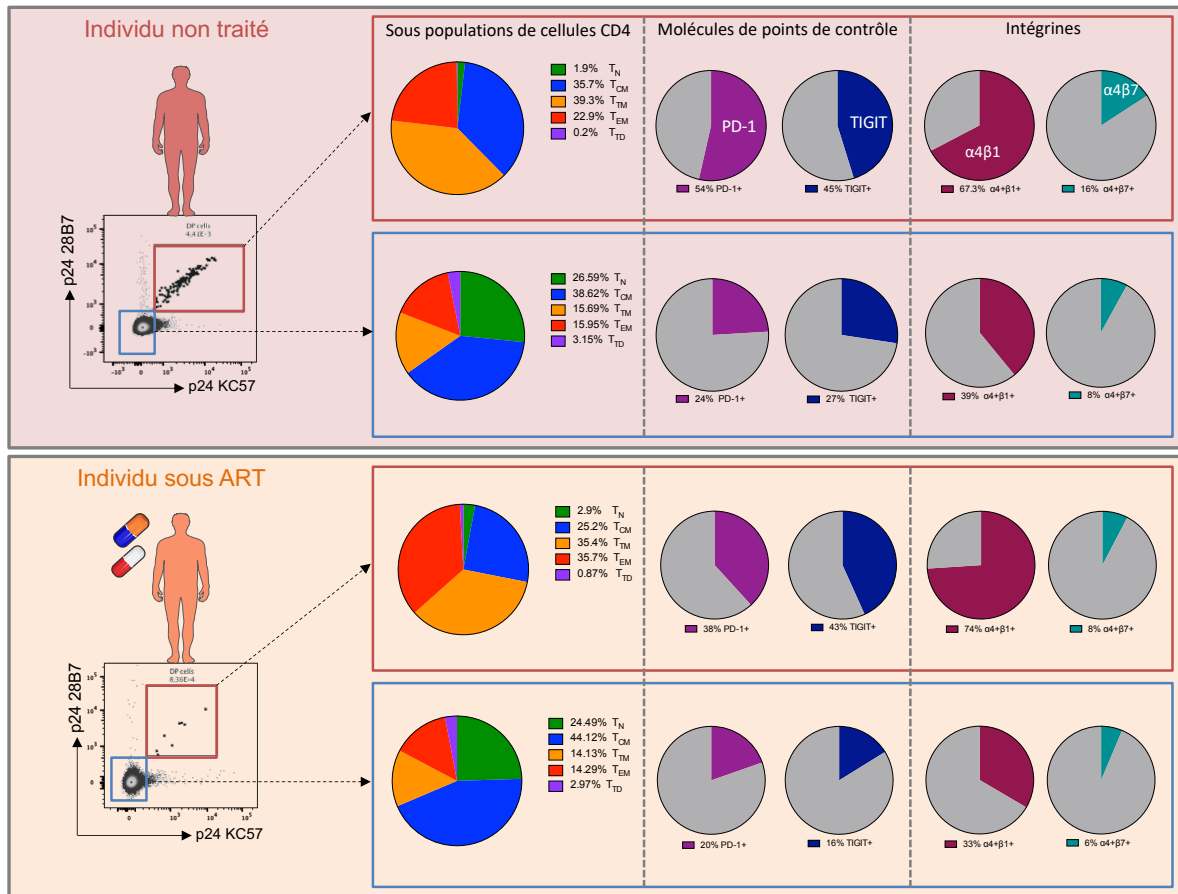
Contexte : Le développement de stratégies thérapeutiques ciblant les cellules réservoirs nécessite une compréhension approfondie du phénotype de ces cellules. Plusieurs molécules ont été identifiées comme préférentiellement exprimées à la surface des cellules infectées de manière latente. L'identification de ces marqueurs d'enrichissement a été réalisée en mesurant l'ADN/ARN du VIH dans des populations purifiées de cellules exprimant ou non ces molécules à leur surface. Néanmoins, la purification de ces sous-populations par cytométrie en flux constitue une étape longue et coûteuse, et cette méthode ne permet d'analyser qu'un faible nombre de sous-populations à la fois. Le développement du mRNA-Flow FISH, permettant d'identifier les cellules qui expriment à la fois l'ARN gag et la protéine p24 par cytométrie en flux, a grandement facilité l'étude du phénotype des cellules réservoirs. Néanmoins, il s'agit d'une méthode relativement coûteuse, laborieuse, qui requiert de grandes quantités de cellules suite aux nombreuses étapes de lavages, montrant l'importance de développer de nouvelles techniques qui peuvent être utilisées à large échelle pour l'identification des cellules réservoirs.

Objectif : Notre objectif était de développer une méthode simple et rapide permettant d'identifier par cytométrie en flux les cellules contenant des virus compétents pour la production de protéines virales. Le développement de cette technique a permis de mesurer la taille des réservoirs viraux ainsi que d'étudier le phénotype des cellules infectées à l'échelle de la cellule individuelle.

Statut de l'article : Cet article a été publié dans la revue *PLoS Pathogens* en février 2019.

Contribution détaillée de chacun des auteurs : Ma contribution personnelle à cet article est de 80%. J'ai réalisé la majorité des expériences présentées dans cet article, et j'ai effectué toutes les analyses de données ainsi que la présentation des figures. Amy Baxter, Daniel Kaufmann et Rémi Fromentin ont participé au développement des expériences. Marta Massannella a réalisé les expériences de QVOA sur les cellules de la cohorte montréalaise. Amélie Pagliuzza, Rémi Fromentin, Marta Massannella, Caroline Dufour et Louise Leyre ont réalisé les mesures d'ADN intégré et de TILDA. Jean-Pierre Routy a supervisé le recrutement des participants. Nicolas Chomont a supervisé chaque étape de cette étude et a édité le manuscrit avec la contribution de chacun des co-auteurs.

Résumé graphique



Points importants à retenir :

- Le HIV-Flow est une méthode de cytométrie en flux permettant de mesurer et de caractériser les cellules infectées contenant un virus compétent pour la traduction protéique chez les individus infectés traités ou non.
- Il s'agit d'une méthode facile, rapide, et qui requiert de relativement faibles nombres de lymphocytes T CD4 (5-10M).
- Chez les individus non traités, les cellules p24+ expriment préférentiellement des marqueurs d'activation (HLA-DR, CD25), des molécules de points de contrôle (PD-1, TIGIT, LAG-3, Tim-3), les intégrines $\alpha 4\beta 7$ et $\alpha 4\beta 1$, et ont préférentiellement un phénotype de cellules T_{TM}.
- Chez les individus sous ART, les cellules p24+ expriment préférentiellement des molécules de points de contrôle (PD-1, TIGIT), l'intégrine $\alpha 4\beta 1$, et ont préférentiellement un phénotype de cellules T_{TM} et T_{EM}.

Single-cell characterization and quantification of translation-competent viral reservoirs in treated and untreated HIV infection

Marion Pardons¹, Amy E. Baxter^{1#}, Marta Massanella^{1#}, Amélie Pagliuzza², Rémi Fromentin², Caroline Dufour¹, Louise Leyre¹, Jean-Pierre Routy³, Daniel E. Kaufmann^{2,4} and Nicolas Chomont^{1,2*}

¹Department of Microbiology, Infectiology and Immunology, Université de Montréal, Montreal, Quebec, Canada

²Centre de Recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal, Montreal, Quebec, Canada

³Division of Hematology & Chronic Viral Illness Service, McGill University Health Centre, Montreal, Quebec, Canada

⁴Department of Medicine, Université de Montréal, Montreal, Quebec, Canada

contributed equally

* Corresponding author:

Nicolas Chomont

Université de Montréal, Centre de Recherche du CHUM, 900 rue St-Denis, H2X 0A9, Montreal, QC, Canada

Tel: +1 514-890-8000 #31266

E-mail: nicolas.chomont@umontreal.ca

Keywords: HIV reservoir, flow cytometry, p24, gag

Abstract

The phenotypic characterization of the cells in which HIV persists during antiretroviral therapy (ART) remains technically challenging. We developed a simple flow cytometry-based assay to quantify and characterize infected cells producing HIV proteins during untreated and treated HIV infection. By combining two antibodies targeting the HIV capsid in a standard intracellular staining protocol, we demonstrate that p24-producing cells can be detected with high specificity and sensitivity in the blood from people living with HIV. In untreated individuals, the frequency of productively infected cells strongly correlated with plasma viral load. Infected cells preferentially displayed a transitional memory phenotype and were enriched in Th17, peripheral Tfh and regulatory T cells subsets. These cells also preferentially expressed activation markers (CD25, HLA-DR, Ki67), immune checkpoint molecules (PD-1, LAG-3, TIGIT, Tim-3) as well as the integrins $\alpha 4\beta 7$ and $\alpha 4\beta 1$. In virally suppressed individuals on ART, p24-producing cells were only detected upon stimulation (median frequency of 4.3 p24+ cells/ 10^6 cells). These measures correlated with other assays assessing the size of the persistent reservoir including total and integrated HIV DNA, Tat/rev Induced Limiting Dilution Assay (TILDA) and quantitative viral outgrowth assay (QVOA). In ART-suppressed individuals, p24-producing cells preferentially displayed a transitional and effector memory phenotype, and expressed immune checkpoint molecules (PD-1, TIGIT) as well as the integrin $\alpha 4\beta 1$. Remarkably, $\alpha 4\beta 1$ was expressed by more than 70% of infected cells both in untreated and ART-suppressed individuals. Altogether, these results highlight a broad diversity in the phenotypes of HIV-infected cells in treated and untreated infection and suggest that strategies targeting multiple and phenotypically distinct cellular reservoirs will be needed to exert a significant impact on the size of the reservoir.

Author Summary

HIV persists in a small pool of infected CD4+ T cells during ART. A better characterization of these cells is a pre-requisite to the development of HIV eradication strategies. We developed a novel assay, named HIV-Flow, to simultaneously quantify and characterize reservoir cells in individuals receiving ART. With this assay, we found that a median of only 5 cells/million have the ability to produce the HIV protein Gag in individuals on suppressive ART. These frequencies correlated with other assays aimed at measuring HIV reservoirs. Importantly, we show that the HIV reservoir is phenotypically diverse, with numerous cell subsets contributing to the pool of persistently infected cells. Nonetheless, we identified several markers preferentially expressed at the surface of these rare reservoir cells, including immune checkpoint molecules and homing receptors. By combining these markers, we identified discrete cellular subsets highly enriched in HIV-infected cells. This novel assay will facilitate the identification of markers expressed by cellular HIV reservoirs.

Introduction

The persistence of a small pool of infected CD4+ T cells displaying a memory phenotype is one of the major hurdles to HIV eradication [1-4]. This persistent viral reservoir is established during the early phase of infection and decays slowly over time [5-7]: more than 70 years of continuous ART would be required to completely purge this small pool of infected cells [8-10]. Therefore, additional therapeutic approaches specifically targeting persistently infected CD4+ T cells are needed to achieve a cure [11]. The development of such targeted strategies requires a deeper characterization of the nature of the cells in which HIV persists during prolonged ART.

A cellular marker that would identify HIV-infected cells with high specificity is still lacking. Although CD32a was originally proposed as a specific marker that highly enriches in HIV-infected cells in individuals on ART [12], recent studies challenged these findings [13-18]. Other cellular markers preferentially expressed by persistently infected cells have been reported, including CD30, CD2, PD-1, LAG-3, TIGIT and CTLA-4 [19-22]. However, these markers do not specifically identify infected cells and do not capture the entire pool of HIV reservoir cells. Similarly, several cell subsets were demonstrated to be enriched in HIV, including Tregs [23], Tfh cells [24, 25] and Th17 cells [26, 27].

Several assays have been developed to measure the frequency of infected cells in ART-suppressed individuals [28, 29]. Since the majority of viral genomes are defective [30], PCR-based assays measuring the frequencies of cells harboring HIV DNA overestimate the size of the replication-competent reservoir [31]. Of note, these defective proviruses are generated during the first rounds of viral replication following transmission, indicating that HIV DNA measurements may overestimate the size of the reservoir even in individuals who received ART during the first few weeks of infection [32]. Inducible RNA assays such as the Tat/rev Inducible Limiting Dilution Assay (TILDA) measure the frequency of cells harboring viral genomes that have the ability to produce viral transcripts upon maximal stimulation [29, 33, 34]. Nevertheless, these assays still overestimate the size of the replication-competent reservoir since a fraction of defective genomes retains the capacity to produce viral transcripts upon stimulation [35]. Other inducible assays measuring the frequency of cells that can produce viral particles after stimulation represent interesting alternatives. However, these assays also require limiting dilution cultures and multiple RNA extraction and RT-PCR, which make them both expensive and cumbersome [36, 37]. The quantitative viral outgrowth assay (QVOA) measures the frequency of resting CD4+ T cells harboring replication competent proviruses [1, 2, 38, 39] and is often considered the gold standard since it provides a minimal estimate of the size of the HIV reservoir. However, it is also time-consuming and labour intensive, and underestimates the size of the reservoir to various levels in different individuals [30, 31]. Finally, full-length sequencing of HIV genomes has the advantage of

capturing intact non-induced genomes but does not functionally assess the ability of these intact viruses to be activated or to replicate in culture [30, 40].

All these methods offer complementary approaches to measure the magnitude of the HIV reservoir during ART. However, unless these assays are combined with cell sorting, none of them allow the phenotypic characterization of the cells in which HIV persists. Flow-cytometric approaches detecting viral proteins would allow to directly phenotype HIV-infected cells. Studies reporting detection of p24⁺ cells by flow cytometry in clinical samples [41, 42] may not exclusively capture HIV-infected cells due to the low specificity of antibodies targeting p24 [43-45]. Consistent with these findings, Graf et al. showed that cells expressing high levels of p24⁺ are highly enriched for HIV DNA, whereas cells expressing intermediate or low levels of p24 are more rarely infected [41]. Recently, fluorescent *in situ* hybridization (flow-FISH) approaches have been developed to detect viral transcripts in HIV-infected CD4⁺ T cells [14, 46, 47]. These flow cytometry-based assays enable the phenotypic characterization of HIV-infected cells expressing the *gag* transcript and/or Gag protein. Together, these studies reported complementary information on the nature of persistently infected cells, on the kinetics of viral reactivation from latency and on the ability of latency reversing agents (LRAs) to induce viral production from latent reservoirs.

Although these assays represent powerful novel technologies to quantify and characterize the cells in which HIV transcripts and/or proteins are produced, several aspects limit their use on a large-scale basis. First, they rely on *in situ* hybridization, and may consequently miss cells harboring viral variants (or HIV subtypes) in which probes may not optimally hybridize to RNA transcripts. Second, they require relatively large number of cells (10-20x10⁶ CD4⁺ T cells) due to material loss occurring during the multiple hybridization and amplification steps required to visualize HIV RNA transcripts by flow cytometry. Third, target-specific sets of probes remain expensive and RNA flow-FISH assays require 2-3 days to be completed.

Herein, we sought to develop a simplified alternative version of these assays that requires relatively small cell input (5-10x10⁶ CD4⁺ T cells) and can be used on a large-scale basis to characterize long-lived HIV reservoirs at the single cell level by flow cytometry. Due to the aforementioned limitations associated with the use of probes specific for RNA transcripts, we focused on the development of an assay that would detect HIV proteins with high specificity and sensitivity using a combination of antibodies.

Results

Detection of p24-producing cells in CD4⁺ T cells isolated from untreated and ART-suppressed HIV-infected individuals

The detection of p24⁺ cells by flow cytometry in clinical samples is technically challenging, since antibodies specific for HIV proteins are notorious for their limited specificity [43-45]. We hypothesized that combining antibodies targeting several viral epitopes would reduce the number of false positive events by improving the specificity of the staining. We used a combination of two antibodies targeting distinct epitopes of the HIV protein Gag (clones KC57 and 28B7, Fig S1A). To induce or enhance p24 production, all samples were stimulated with PMA/ionomycin. As expected, each antibody resulted in significant background when used individually in samples from HIV-uninfected individuals (Fig S1B). By combining these two antibodies, no signal was observed within the double positive gate with samples from HIV negative controls. In contrast, a clear double positive signal was obtained in samples from people with HIV (Fig 1A, Fig S1).

We used this method (referred as HIV-Flow) to compare the frequency of cells producing p24 in samples obtained from treated and untreated individuals with HIV in the absence of stimulation or following stimulation (Fig 1B). Without stimulation, we failed to detect p24⁺ cells in samples obtained from six ART-suppressed individuals, whereas p24-producing cells were detected in samples from all six viremic participants (Fig 1C). Of note, the vast majority (97.6%) of these productively infected cells did not express CD4, likely as a consequence of the down-regulation of the receptor by Nef, Vpu and Env (Fig 1D-E) [48-50]. Stimulation with PMA/ionomycin revealed a population of p24-producing cells in all samples from the six virally suppressed individuals, which is consistent with the translationally inactive nature of the viral reservoir during ART ($p=0.03$, Fig 1C). In addition, frequencies of p24-producing cells modestly increased in samples from the six untreated participants (2.1-fold, $p=0.03$, Fig 1C), suggesting that translationally inactive infected cells are also present during untreated HIV infection. In addition to this slight increase in the frequency of p24⁺ cells, we observed a significant increase in the mean fluorescence intensity within the p24⁺ population for both antibodies (2.2 and 2.7-fold for p24 28B7 and p24 KC57, respectively, $p=0.03$ for both, Fig S2), indicating that the amount of p24 molecules per cell increased upon stimulation.

Specificity, sensitivity, reproducibility and linearity of HIV-Flow

To evaluate the specificity of the HIV-Flow assay, we used flow cytometry cell sorting to isolate p24⁺ and p24⁻ cells following PMA/ionomycin stimulation of CD4⁺ T cells obtained from four individuals with HIV (two untreated and two suppressed on ART). Quantification of HIV DNA by ultrasensitive PCR in the sorted populations demonstrated a marked enrichment of HIV genomes in the p24⁺ cells compared to their negative counterparts (Fig 2A). p24⁺ cells harbored

1 to 1.5 HIV DNA copies per cell whereas 0 to 0.02 HIV genomes/cell were measured in the negative fractions (Fig 2A). An average 800-fold enrichment in cells harboring HIV DNA was observed in sorted p24+ cells compared to unsorted CD4+ T cells. Of note, single positive cells contained low levels of HIV DNA (Fig S3).

To further validate the specificity of the assay, we sorted single p24- and p24+ cells from three ART-suppressed individuals and subjected these single cells to HIV DNA amplification (Fig S4). The presence of a single cell per well was confirmed by the detection of CD3 gene. While almost all p24- cells were devoid of HIV DNA, HIV genomes were detected in 60% to 75% of the wells containing p24+ cells, indicating that the majority of the p24+ events detected by HIV-Flow harbored HIV DNA that could be amplified using our assay.

To evaluate the reproducibility of HIV-Flow, we measured the frequency of p24-producing cells upon stimulation with PMA/ionomycin in seven samples from virally suppressed individuals analyzed in 2-5 independent experiments (Fig 2B). The mean coefficient of variation was 0.2, indicating that HIV-Flow measures were reproducible. To assess the linearity of HIV-Flow measures, we spiked *in vitro* HIV-infected CD4+ T cells in uninfected CD4+ T cells isolated from an HIV-uninfected control (Fig 2C). The co-staining p24 KC57/p24 28B7 showed an excellent linearity to the lowest dilution tested (3.2 p24+ cells/10⁶ cells; R²=0.97). In contrast, each individual staining was weak predictor of the frequency of p24+ cells, confirming the low specificity of p24 antibodies when used individually [43-45]. To compare HIV-Flow and the mRNA Flow FISH assay for their ability to detect infected cells in clinical samples, we applied our method on samples previously analyzed by Baxter et al. [46]. We observed a highly significant correlation between both assays ($r=0.78$, $p<0.0001$, Fig 2D), indicating that HIV-Flow and mRNA Flow FISH provide similar estimates of the size of the translation competent reservoir in clinical samples.

Relationships between HIV-Flow, plasma viral load and reservoir measures

We used HIV-Flow to measure the frequency of p24-producing cells upon stimulation with PMA/ionomycin in CD4+ T cells isolated from 20 untreated and chronically infected individuals (Table 1, VIR1-20). We measured a median frequency of 87 p24+ cells/10⁶ cells (IQR=22-215 cells/10⁶ cells). Frequencies of p24+ cells were strongly correlated with plasma viral loads ($p<0.0001$, $r=0.90$, Fig 3A). We calculated the absolute numbers of p24+ cells per μL of blood and determined linear regression between plasma viral load (copies/ μL) and the absolute number of p24+ cells per μL of blood ($p<0.0001$; $r=0.95$, $\log(Y)=0.67*\log(X)-2.4$; Fig 3B). Based on this analysis, we estimated that each individual p24+ cell detected in the blood was associated to approximately 2,000 viral particles in the plasma.

To evaluate the ability of HIV-Flow at estimating the size of the persistent HIV reservoir in ART-suppressed individuals, we used samples from a cohort of 24 well-characterized participants on ART for a median of 9.9 years (Table 2, ART1-24). Upon stimulation of CD4+ T cells with

PMA/ionomycin, we measured a median frequency of 4.3 p24+ cells/10⁶ cells (IQR 0.7-8.0, Table 2). This frequency of infected cells was intermediate between mQVOA (median=0.9 IUPM) and TILDA (median=20.1 cells/10⁶ CD4+ T cells) and dramatically lower than the frequency of cells harboring HIV DNA (medians of 1,014 and 510 copies/10⁶ cells for total and integrated HIV DNA, respectively, Fig 3C). Interestingly, the frequency of p24+ cells measured by HIV-Flow correlated with the levels of total HIV DNA ($r=0.56$, $p=0.004$), integrated HIV DNA ($r=0.57$, $p=0.004$) and with the frequency of cells producing Tat/rev RNA measured by TILDA ($r=0.65$, $p=0.0005$, Fig 3D). Although the association was weaker, we also observed a statistically significant correlation between the frequencies of infected cells measured by HIV-Flow and mQVOA ($r=0.43$, $p=0.04$, Fig 3D). Taken together, our results indicate that the HIV-Flow assay, which detects cells harboring translation-competent genomes, measures frequencies of infected cells that are intermediate between viral RNA induction assays (transcription-competent genomes) and mQVOA (replication-competent genomes). In addition, our results suggest that this novel assay may be used as a surrogate for other methods aimed at measuring the size of the HIV reservoir in virally suppressed individuals.

Phenotypic analysis of infected cells in untreated HIV infection

To determine if specific cell subsets are enriched in productively infected cells during untreated HIV infection, we developed several panels of antibodies (Table S2) to simultaneously quantify and phenotype p24+ cells in samples from viremic individuals. CD4+ T cells from 8 untreated participants were rested for 18h and stained for cell-surface markers and intracellular p24.

Since T cell activation is required for productive infection [51], we first assessed whether CD4+ T cells displaying an activated phenotype were enriched in productive HIV. Several markers of T cell activation or proliferation were significantly enriched in productively infected cells, including CD25 ($p=0.02$), HLA-DR ($p=0.04$) and Ki67 ($p=0.008$) (Fig 4A, S5A, and Table S3). In contrast, p24+ cells were not enriched in CD4+ T cells expressing CD69 and CD38, suggesting that a restricted number of activation markers are associated with productive HIV infection. Furthermore, the death receptor Fas (CD95), whose expression increases upon T cell activation [52, 53], was expressed by 95% of p24+ cells ($p=0.008$, Fig 4A, S5A and Table S3). To determine if the combination of multiple markers of activation/proliferation could further enrich in p24+ cells, we performed a Boolean analysis with the receptors we identified as preferentially expressed by p24+ cells (CD25, HLA-DR, CD95, Ki67). In the majority of the samples tested, the frequency of p24+ cells progressively increased with the number of markers co-expressed (median frequencies = 3, 90, 174, 387, and 745, for cell subsets expressing 0, 1, 2, 3, 4 markers, respectively, Fig S6A).

Since T cell activation leads to the upregulation of several immune checkpoint molecules [54], we also measured the expression of LAG-3, Tim-3, PD-1 and TIGIT in p24+ cells. Strikingly, all these immune checkpoint molecules significantly enriched in productively HIV-infected cells (LAG-3, $p=0.008$; Tim-3, $p=0.008$; PD-1, $p=0.02$ and TIGIT, $p=0.02$; Fig 4B, S5A and Table S3). By performing a Boolean analysis with these 4 markers, we observed that the highest frequencies of p24+ cells were detected in cell subsets co-expressing 3 or 4 immune checkpoint molecules (median frequencies = 72, 134, 131, 539, and 403, for cell subsets expressing 0, 1, 2, 3, 4 molecules, respectively Fig S6A).

Since memory CD4+ T cells have previously been shown to be preferentially targeted by HIV [55], we then analyzed the memory status of p24+ cells by focusing on naïve (T_N : CD45RA+CCR7+CD27+), central memory (T_{CM} : CD45RA-CCR7+CD27+), transitional memory (T_{TM} : CD45RA-CCR7-CD27+), effector memory (T_{EM} : CD45RA-CCR7-CD27-) and terminally differentiated (T_{TD} : CD45RA+CCR7-CD27-) cells (Fig 5A, S5A, S7A and Table S3). Productively infected cells were enriched in the T_{TM} subset ($p=0.008$, Fig 5A) which encompassed 39% of all p24+ cells (Fig S7A). Conversely, p24+ cells rarely displayed a T_N or T_{TD} phenotype (1.9 and 0.2%, respectively). Although a significant fraction of p24+ cells also displayed a T_{CM} (36%) or T_{EM} (23%) phenotype, these subsets were not significantly enriched in infected cells during untreated HIV infection.

Several studies have shown that HIV preferentially infects CD4+ T cells endowed with specific effector functions, including Th17 [26, 27], T follicular helper cells (Tfh) [24, 46] and regulatory T cells (Treg) [56, 57]. We used HIV-Flow to assess the relative contribution of these subsets to the pool of productively infected cells. Using antibodies specific for CCR4, CXCR3 and CCR6, we identified 6 populations of cells as described previously [26]. The greatest levels of enrichment were observed in Th17 cells (CXCR3-CCR4+CCR6+) and CXCR3+CCR4+ cells which encompassed 25% ($p=0.008$) and 21% ($p=0.008$) of all p24+ cells, respectively (Fig 5B, S5A, S7A and Table S3). Conversely, p24+ were underrepresented within the CXCR3-CCR4- subsets ($p=0.008$). Of note, some p24+ cells were detected within the Th1 (CXCR3+CCR4-CCR6-), Th1Th17 (CXCR3+CCR4-CCR6+) and Th2 subsets (CXCR3-CCR4+CCR6-) (21%, 2.8% and 13%, respectively), but none of these subsets were significantly enriched in infected cells (Fig 5B, S5A, S7A and Table S3). In contrast, both peripheral T follicular helper cells (CXCR5+PD-1+) and regulatory T cells (CD25+CD127-) were enriched for p24+ cells ($p=0.015$ for both subsets) and encompassed 9.5% and 5.5% of infected cells, respectively (Fig 5C and Table S3).

The integrin $\alpha 4\beta 7$ defines a T cell subset that is highly susceptible to HIV infection [58, 59]. Using HIV-Flow, we observed that cells expressing this homing receptor were enriched in p24+ cells ($p=0.015$, respectively, Fig 5D, S5A and Table S3). Interestingly, we also observed a significant enrichment in p24+ cells within $\alpha 4\beta 1+$ cells ($p=0.008$). Taken together, our results indicate that productively infected cells are enriched in specifically differentiated (T_{TM}) and effector

(Th17, CXCR3+CXCR4+, Tfh, Treg cells) subsets as well as in cells expressing immune activation markers, immune checkpoint molecules and homing receptors.

Phenotypic analysis of persistently infected cells in virally suppressed individuals.

To identify the phenotype of persistently infected cells during ART, we stimulated CD4+ T cells from 12 virally suppressed individuals with PMA/ionomycin and used several panels of antibodies as above (Table S2). Since PMA/ionomycin led to increased expression of several cell surface markers of interest, we stimulated CD4+ T cells in the presence of brefeldin A (BFA) to prevent upregulation of these molecules. Although most of the markers of interest retained their expression using this approach (Fig S8), analysis of functional subsets was not possible due to dramatic changes in the expression of CCR6, CXCR3, CCR4, CXCR5, CD25 and CD127, even in the presence of BFA (Fig S9A-B). In addition, CD4 downmodulation was still observed after PMA/ionomycin stimulation despite the use of BFA, which did not allow us to assess CD4 expression in p24+ cells from ART-suppressed individuals (Fig S9C).

We previously demonstrated that the immune checkpoint molecules PD-1, LAG-3 and TIGIT are preferentially expressed at the surface of CD4+ T cells harboring integrated HIV DNA [21]. We used HIV-Flow to determine if these cell surface markers would also enrich in translation-competent genomes. PD-1 and TIGIT expressing cells were enriched in p24-producing cells ($p=0.04$ and $p=0.001$, respectively, Fig 6A, S5B and Table S3), whereas p24+ cells were not preferentially detected in CD4+ T cells expressing LAG-3 and Tim-3. We performed a Boolean analysis to determine if the combination of PD-1 and TIGIT further enriched in p24+ cells. Interestingly, p24+ cells were rarely found in cells expressing none of these markers, whereas cells expressing one or two markers were significantly enriched in p24+ cells compared to all cells. Of note, in 5/11 individuals, the degree of enrichment was further increased when PD-1 and TIGIT were co-expressed compared to cells expressing only one marker (Fig S6B).

Several studies have demonstrated that HIV genomes preferentially persist in CD4+ T cells displaying a memory phenotype, including T_{CM} , T_{TM} and T_{EM} cells [60-62]. Analysis of the memory phenotype of p24+ cells by HIV-Flow revealed that the majority of cells carrying translation-competent genomes displayed a T_{TM} or T_{EM} phenotype (35.4% and 35.7%, $p=0.0015$ and $p=0.001$, respectively), whereas p24+ T_N and T_{TD} were rare in individuals on ART (2.9% and 0.9%, respectively, Fig 6B, S5B, S7B and Table S3). Although a significant fraction of p24+ cells displayed a T_{CM} phenotype (25.2%), infected cells were slightly underrepresented within this subset ($p=0.04$). Unlike what we observed in samples from untreated individuals, the $\alpha 4+\beta 7+$ subset was not enriched in p24+ cells in virally suppressed individuals (Fig 6C, S5B and Table S3). In contrast, the $\alpha 4+\beta 1+$ population remained significantly enriched in p24-producing cells during ART ($p=0.0005$), with 74% of p24+ cells expressing this homing receptor on their surface.

Since CD32a was recently proposed as a marker of CD4⁺ T-cells harboring replication-competent proviruses during ART [12], we used HIV-Flow to determine if p24-producing cells from ART-suppressed individuals were enriched in the CD32^{high} population. Following stimulation with PMA/ionomycin in the presence of BFA, we observed a slight increase in the proportion of cells expressing CD32a (0.15% to 0.32% CD32⁺ cells, Fig S10A). In samples from four ART-suppressed individuals, none of the p24-producing cells were found to express high levels of CD32 (Fig S10B), indicating that the majority of the cells harboring translation competent HIV do not express CD32 in individuals on ART.

Altogether, our results indicate that the cells in which HIV persists during ART are phenotypically diverse, with significant enrichment for translation-competent HIV genomes in cells displaying differentiated memory phenotypes (T_{TM} and T_{EM} cells) as well as in subsets of cells expressing PD-1, TIGIT and α 4 β 1.

To determine if the cell surface markers we identified as preferentially expressed by infected cells could be used in combination to further enrich in p24⁺ cells, we combined antibodies to CD45RA, PD-1, TIGIT and α 4 β 1 in a single antibody panel. We observed that the highest degree of enrichment was obtained in cells displaying a CD45RA⁻, α 4 β 1⁺, TIGIT⁺ phenotype (5.4-fold enrichment, p=0.008, Fig S11).

Discussion

An increasing number of interventions aimed at reducing the size of the HIV reservoir are currently under evaluation in clinical trials [11]. Measuring the efficacy of these strategies requires precise quantification of the frequency of infected cells [29, 63]. The phenotypic characterization of these long-lived reservoir cells is also of great interest since several eradication strategies target specific cellular reservoirs. Currently, mRNA Flow-FISH, which relies on the simultaneous detection of HIV transcripts and p24 protein by flow cytometry [46], is the only approach that can simultaneously measure the frequency and assess the phenotype of infected CD4⁺ T cells persisting in ART-suppressed individuals. Herein, we developed a simpler version of the mRNA flow FISH assay that requires only 5-10 million CD4⁺ T cells, can be completed in two days, and can be used on a large scale to quantify and phenotype the translation-competent HIV reservoir. We found that HIV-Flow is reproducible and linear to the lowest dilution tested. Cell sorting of p24⁻ and p24⁺ cells revealed that p24⁺ cells harbored on average 1 to 1.5 HIV DNA copies per cell, whereas 0 to 0.02 HIV genomes/cell were measured in p24⁻ cells. Of note, we measured 1.0-1.5 copies of HIV DNA per p24⁺ cell (average = 1.25 copies/cell), which is slightly higher than the frequency of 1 copy per cell previously reported [64]. This may be explained by multiple infections of a single cell or by the relative imprecision of the quantitative PCR assay. In addition, although the majority of single sorted p24⁺ cells harbored detectable HIV DNA, an HIV genome could not be amplified in 25-40% of p24⁺ single cells, likely reflecting the inefficient amplification of a single viral genome.

Using HIV-Flow, we measured a median frequency of 4.3 p24-producing cells/10⁶ cells in ART-suppressed individuals. This is 200 times lower than the frequency of cells harboring total HIV DNA (1,014 cells/10⁶ cells), reflecting an important gap between the total number of HIV DNA molecules and the small fraction of genomes that can lead to the production of a correctly folded p24 protein. This is in line with the high proportion of genomes carrying hypermutations or internal deletions as previously reported [30, 40, 65]. Similarly, HIV-Flow frequencies are 4.7 times lower than those measured by TILDA (median = 20.1 copies/10⁶ CD4 T cells), suggesting that a significant proportion of proviruses may give rise to mRNA upon stimulation but not to p24 protein. The frequency of p24-producing cells measured by HIV-Flow was also 4.8 times higher than the one measured by mQVOA (median = 0.9 IUPM), suggesting that a fraction of p24-producing cells do not harbor replication-competent proviruses likely as a consequence of defects in other viral genes. This difference in frequencies between HIV-Flow and mQVOA may also be explained if spreading infection is not fully efficient following the induction of replication competent proviruses in co-culture. In spite of these dramatic differences in these measures, we observed that the frequencies of p24-producing cells assessed by HIV-Flow correlated with several other assays aimed at quantifying the size of the reservoir (integrated HIV DNA, TILDA, and mQVOA).

Taken together, our results indicate that, as expected, HIV-Flow measures a frequency intermediate between viral RNA induction assay and replication-competent HIV and may be used as a surrogate for several of these assays.

We took advantage of this approach to identify cellular subsets enriched in HIV-infected cells during untreated and treated infection. Strikingly, the vast majority (97.6%) of productively infected T cells displayed low levels of CD4 on their surface, likely as a result of Nef, Vpu and/or Env-mediated downregulation, as previously proposed [48-50]. This indicates that the functions of Nef/Vpu/Env are preserved in the majority of p24-producing cells, suggesting that Gag production is usually accompanied by the production of other functional HIV proteins. Productively infected cells were characterized by higher levels of immune activation as demonstrated by heightened expression levels of several activation markers including CD25, HLA-DR and Ki67. This is in line with previous studies reporting that proliferating activated CD4⁺ T lymphocytes are more susceptible to HIV infection compared to resting CD4⁺ T cells [51, 66]. Accordingly, several immune checkpoint molecules which are upregulated during T cell activation like PD-1, TIGIT, LAG-3, Tim-3 [54] were also preferentially expressed by productively infected cells. We also assessed the memory phenotype of the infected cells and observed that productively infected CD4⁺ T cells were more likely to display a transitional memory phenotype than their uninfected counterparts, as previously reported in *in vitro* infection studies [67]. Conversely, p24⁺ cells were rarely detected within the naive and terminally differentiated subsets, which may be explained by the relative resistance of naive CD4⁺ T cells to HIV-infection by CCR5-using strains [68, 69] and by the short life-span of terminally differentiated cells. Using chemokine receptors to predict the functionality of these cells, we observed that the Th17 subsets encompassed the largest proportion of productively infected CD4⁺ T cells (25%). This is in accordance with previous studies in which CCR6⁺ T cells were shown to be highly permissive to HIV infection [27], likely as a result of their heightened expression of HIV dependency factors [70]. We also observed that peripheral Tfh cells and Treg cells were enriched in productively infected cells, which is also supported by previous findings [24, 46, 56, 57]. In fact, peripheral Tfh represent the circulating counterparts of germinal center Tfh cells [71], which have been shown to serve as the major compartment for HIV production and replication during untreated HIV infection [24].

In the SIVmac251 model, peripheral memory CD4 T cells expressing high levels of $\alpha 4\beta 7$ were shown to be preferentially infected during the very early phase of infection [72] and to be preferentially depleted from gut tissues as early as the first 2 weeks following infection in humans [59]. In line with these data, we observed that p24-producing cells were enriched in the $\alpha 4\beta 7$ ⁺ subset in 7/8 untreated individuals, which is consistent with their ability to home to the gut-associated lymphoid tissue (GALT), a compartment in which inflammation is heightened during chronic untreated HIV infection and in which HIV replication may be favoured. Interestingly, we identified the integrin $\alpha 4\beta 1$ as a cell surface molecule expressed by a large fraction of productively

infected cells. Since $\alpha 4\beta 1$ drives homing to the inflamed central nervous system [73] and to the bone marrow [74], our results suggest that these compartments may also contribute to HIV replication during untreated HIV infection.

Altogether, our results demonstrate the broad diversity of the cells in which HIV replicates during untreated HIV infection including cells displaying an activated phenotype, cells expressing immune checkpoint molecules, transitional memory cells, Th17, Tregs, pTfh as well as T cells expressing homing receptors to inflamed tissues.

The identification of a cellular marker specifically expressed by persistently infected cells in individuals on ART remains elusive. Although the Fc-gamma receptor CD32 was originally proposed to mark these cells [12], our own measures using HIV-Flow as well as other recent studies did not confirm these observations [13-18]. Rather, our results suggest that the latent reservoir, similar to the pool of productively infected cells in untreated individuals, is broadly diverse. Yet, we identified T cell phenotypes that are enriched in p24-producing cells in the blood of individuals on ART. There are multiple reasons why specific cellular proteins would be preferentially expressed at the surface of p24-producing cells: these molecules could be upregulated as a consequence of HIV infection or could be preferentially expressed by cells highly sensitive to HIV infection. Alternatively, infected cells expressing these markers may have a selective advantage to persist over time.

Although infected cells were detected in all memory subsets as reported previously [60], we found T_{TM} and T_{EM} cells to be particularly enriched in p24+ cells, which is consistent with the fact that these subsets contain the largest fraction of intact proviruses [40]. We also observed that CD4+ T cells expressing PD-1 and TIGIT are enriched in infected cells, as we previously reported using quantification of integrated HIV DNA and TILDA [21]. Unlike what we observed in untreated HIV infection, we did not observe an enrichment of p24-producing cells in the $\alpha 4+\beta 7+$ population in virally suppressed individuals, possibly as a result of the retention of these cells in the GALT. In contrast, enrichment in $\alpha 4+\beta 1+$ cells persisted after viral suppression. This may result from a combination of functions ensured by $\alpha 4\beta 1$. Indeed, $\alpha 4\beta 1$ not only mediates the adhesion and transendothelial migration of leukocytes, but also provides costimulatory signals that contribute to the activation of T lymphocytes [75], which may facilitate infection of T cells expressing $\alpha 4\beta 1$ through proximate contact. In addition, $\alpha 4+\beta 1+$ cells not only home to the inflamed CNS, but also preferentially migrate to secondary lymphoid organs [76, 77], which represent important HIV reservoirs during ART. Therefore, $\alpha 4\beta 1$ expression may facilitate HIV persistence by enhancing T cell expansion, a major mechanism of HIV persistence during ART, as well as through migratory effects.

We acknowledge several limitations to our study. First, HIV-Flow may underestimate the frequency of p24-producing cells in samples from viremic individuals due to high levels of cell death and cellular turnover when compared to cells from ART-suppressed individuals [78].

Moreover, it is likely that a fraction of the cells harboring translation-competent viruses would require more than one round of stimulation to be reactivated, as it was described for QVOA [30]. Unlike QVOA, HIV-Flow does not measure replication-competent HIV and it is likely that a significant fraction of p24+ cells measured in our assay does not produce intact viral particles that have the ability to replicate in culture. Since Rev and RRE are not essential for Gag expression, proviruses with massive 3' deletions could still produce p24 [79, 80]. Therefore, obtaining full length HIV sequences in p24+ cells will be important to determine the fraction of translation competent genomes that are intact. This overestimation of the size of the reservoir may vary between individuals and whether the frequency of infected cells measured by HIV-Flow can be used to predict control of HIV replication during analytic treatment interruption remains to be determined. Another limitation of HIV-Flow is the need to activate CD4+ T cells to detect intracellular p24 in samples from virally suppressed individuals, which results in alteration in the phenotype of the cells. Although this phenomenon can be attenuated by adding BFA during the stimulation, several cell surface markers, including CD4, could not be analyzed using our assay. Future studies will also need to investigate the possibility of detecting and characterizing p24+ cells in tissues, since anatomical compartments carry the majority of persistent HIV/SIV during ART [81, 82]. Although the HIV-Flow assay only requires relatively limited numbers of cells, we agree that obtaining 5-10 million CD4+ T cells may be challenging in clinical studies in which repeated samplings are required or in pediatric studies. In addition, the limited number of cells that can be recovered from tissue sampling may not allow sufficient sensitivity to detect p24+ cells by HIV-Flow. Future studies will also be needed to determine whether various HIV clades can be recognized by the two antibodies used to detect p24.

In conclusion, we developed a new flow cytometry-based assay that allows the simultaneous quantification and phenotyping of p24-producing cells both in untreated and ART-suppressed individuals. By combining our assay and novel flow cytometry or mass cytometry approaches that allow the analysis of 30-50 parameters simultaneously, the identification of cellular subsets highly enriched in HIV in blood and tissues from individuals living with HIV could become a more realistic endeavor.

Materials and Methods

Participants and blood collection

All participants underwent leukapheresis to collect large numbers of PBMCs. A total of 21 untreated viremic individuals and 39 individuals on stably suppressive ART participated in this study. Characteristics of the participants are summarized in Tables 1 and 2. PBMCs were isolated by Ficoll density gradient centrifugation and were cryopreserved in liquid nitrogen.

Ethics statement

All participants were adults and signed informed consent forms approved by the McGill University Health Centre, the Centre Hospitalier de l'Université de Montréal and the Martin Memorial Health Systems review boards.

Antibodies

We used a combination of two antibodies directed to p24: p24 KC57-PE was obtained from Beckman Coulter (6604667) and p24 28B7-APC was obtained from MediMabs (MM-0289-APC). The following antibodies were used for staining: CD3 (UCHT-1), CD4 (SK3), CD8 (RPA-T8), CD45RA (HI100), CCR7 (3D12), PD-1 (EH12.1), β 1 (MAR4), β 7 (FIB504), CD69 (FN50), CD25 (M-A251), HLA-DR (G46-6), CD38 (HIT2), Ki67 (MOPC-21), CD95 (DX2), CD39 (Tu66), CD127 (HIL-7R-M21), CXCR3 (1C6), CCR4 (1G1), CCR6 (11A9) were purchased from BD Bioscience. LAG-3 (FAB2319) was obtained from R&D systems, and TIGIT (MBSA43) from eBioscience. CD27 (O323), Tim-3 (F38-2E2), α 4 (9F10), CD28 (CD28.2) and CD32 (FUN-2) were purchased from BioLegend. Live/Dead Aqua Cell Stain (405nm) was obtained from ThermoFisher Scientific (L34957). Detailed panels of antibodies are reported in Table S2.

HIV-Flow procedure

Upon thawing PBMCs, CD4⁺ T cells were isolated by negative magnetic selection using the EasySep™ Human CD4 T Cell Enrichment Kit (StemCell Technology, 19052). Purity was typically >98%. 5-10x10⁶ CD4⁺ T cells were resuspended at 2x10⁶ cells/mL in RPMI + 10% Fetal Bovine Serum and antiretroviral drugs were added to the culture (200nM raltegravir, 200nM lamivudine). Cells were stimulated with 1 μ g/mL ionomycin (Sigma, I9657) and 25nM (18h) or 162nM PMA (24h) (Sigma, P8139) for samples from viremic and aviremic individuals, respectively. In phenotypic characterization experiments, samples from ART-suppressed individuals were pre-incubated for 1h with 5 μ g/mL Brefeldin A (BFA, Sigma, B2651) before stimulation in order to prevent the upregulation of cell surface markers. BFA was maintained in the culture until the end

of the stimulation. After stimulation, cells were collected, resuspended in PBS and stained with the Aqua Live/Dead staining kit for 30min at 4°C. Cells were then stained with antibodies against cell surface molecules in PBS + 4% human serum (Atlanta Biologicals, 540110) for 30min at 4°C. After a 15min-fixation step at room temperature (RT) with 4% formaldehyde, cells were permeabilized for 30min at 4°C using the PermWash buffer (BD Biosciences, 554723), and stained with anti-p24 KC57 and anti-p24 28B7 antibodies for an additional 45min at RT. Cells were then washed and resuspended in PBS for subsequent analysis. In some experiments, the fixation/permeabilization step was performed with the FoxP3 Transcription Factor Staining Buffer Set (eBioscience, 00-5523-00) following the manufacturer's instructions. Similar frequencies of p24+ cells were obtained using both permeabilization buffers (PermWash Buffer from BD versus FoxP3 Buffer Set from eBioscience; Fig S12). Our detailed laboratory protocol describing all steps of the HIV-Flow procedure is accessible here: dx.doi.org/10.17504/protocols.io.w4efgte.

HIV Flow: Gating strategy and data analysis

The frequency of p24 double positive cells (KC57+, 28B7+) was determined by flow cytometry (BD LSRII) in gated viable CD4 T cells. This gate included both CD4 positive and CD4 negative T cells and was referred as “all cells” in this study. An example of the gating strategy is represented in Fig S13. Samples with cell viability < 50% post-stimulation, as assessed by LIVE/DEAD staining, were excluded from the analysis. In all experiments, CD4+ T cells from an HIV-negative control were included to set the threshold of positivity. In immunophenotypic experiments, we used the following gating strategy: markers that are typically expressed at low levels in naïve cells (activation/proliferation markers, immune checkpoint molecules) were gated against CD45RA, whereas CD38 and CD95 were gated against CD4.

Flow cytometry cell sorting

Cells were sorted in 96-well PCR plates containing 15µL of proteinase K lysis buffer (0.1M Tris HCl, 0.5M KCl, 10mg/mL proteinase K from Life Technologies 25530-015). Single cells and up to a 1,000 cells per well were sorted on a BD FACS ARIA III. The PCR plates were subsequently incubated at 55°C for 16 hours for cell lysis followed by a 5min-incubation step at 95°C to inactivate proteinase K.

Quantification of total and integrated HIV DNA

Frequencies of CD4+ T cells harboring total and integrated HIV DNA were measured by real time nested PCR, as previously described [83]. Briefly, cells were lysed by proteinase K digestion. Cell

lysates were directly used for HIV DNA quantifications. Total HIV-1 DNA was amplified with primers annealing the LTR/*gag* region. Integrated HIV DNA was amplified with Alu primers together with a primer annealing the LTR. In all PCR reactions, primers specific for the CD3 gene were added to precisely quantify the cell input. In a second round of PCR, appropriate primers and probes were used to amplify HIV sequences from the first round of amplification. Inner primers specific for the CD3 gene were used in a separate reaction to determine cell input. The number of copies of total and integrated HIV-1 DNA were calculated by using serial dilutions of lysed ACH-2 cells as a standard curve. All measures were performed in triplicate wells (except for plate cell sorting of p24+ cells). Results were expressed as numbers of HIV copies per million cells.

Linearity of the assay

Purified CD4+ T cells from an HIV uninfected donor were activated with phytohemagglutinin-L (10 µg/ mL) for 48 hours and then maintained in RPMI 1640 complete medium supplemented with rIL-2 (100 U/mL). HIV NL4.3 was then used to infect activated primary CD4+ T cells by spin infection at 800 × g for 1 h in 96-well plates at 25 °C. *In vitro* infected CD4+ T cells were spiked at different ratios in CD4+ T cells purified from an HIV-uninfected control. The linearity of the assay was determined by comparing the predicted frequency of infected cells to the measured frequencies of p24+ cells obtained by single p24 staining with KC57 or 28B7 or by dual staining p24 KC57/p24 28B7.

Tat/rev inducible limiting dilution assay (TILDA)

The frequency of CD4+ T cells with inducible multiply spliced HIV RNA was determined using TILDA as previously described [34].

RNA-Flow FISH

The frequency of cells harboring simultaneously *gag* transcripts and Gag proteins was determined using RNA-Flow FISH, as previously described [46, 84].

Modified quantitative viral outgrowth assay (mQVOA)

Purified CD4+ T cells were serially diluted in Costar plates coated with anti-CD3 (2.5µg/ml, Clone OKT3) and anti-CD28 (1µg/mL, Clone CD28.2, BioLegend 302902) monoclonal antibodies. Five serial 3-fold dilutions were performed at a starting concentration of 1x10⁶ cells/well (first dilution in a 24-well plate and following dilutions in a 96-well plate), with 6 replicates per dilution. After two days of stimulation, 50,000 or 10,000 MOLT-4/CCR5+ cells (NIH AIDS Reagent Program, 4984)

were added to 24- or 96- well cell culture plates, respectively (day 0). Cell cultures were split twice weekly and half of cell culture supernatants (500µl or 100µl) were collected at days 7, 14 and 21 for quantification of soluble HIV-p24 protein. Supernatants were lysed and kept at -80°C until use. p24 protein was quantified by ELISA as previously described [85]. The number of wells positive for soluble p24 protein was determined, and the maximum likelihood method was applied to determine infectious units per million of cells (IUPM) (<http://silicianolab.johnshopkins.edu/>) [86].

Statistical analyses

All data were analyzed using Graphpad Prism v6.0h. To compare frequencies of infected cells measured by total and integrated HIV DNA, TILDA, mQVOA and HIV-Flow, values were transformed in $\log_{10}([\text{HIV copies}/10^6 \text{ cells}] + 1)$. Results were represented as median or mean values, with interquartile range or minimum and maximum values, as indicated in the figure legends. Correlations were determined using nonparametric Spearman's tests. For enrichment data, non-parametric Wilcoxon matched-pairs signed rank tests were used. P values of less than 0.05 were considered statistically significant.

Acknowledgements

The study team is grateful to the individuals who volunteered to participate in this study. The authors thank Josée Girouard, Mario Legault, Moti Ramgopal and Brenda Jacobs for recruitment and clinical assistance with study participants. We also thank Andrés Finzi, Jonathan Richard and Jérémie Prévost for performing *in vitro* infections and for useful advices. We thank the flow cytometry core at the CRCHUM, managed by Dominique Gauchat and Philippe St-Onge; and the NC3 core, managed by Olfa Debbeche. The authors are grateful to MediMabs for providing the p24 28B7 antibody and for helpful discussions.

References

1. Finzi D, Hermankova M, Pierson T, Carruth LM, Buck C, Chaisson RE, et al. Identification of a reservoir for HIV-1 in patients on highly active antiretroviral therapy. *Science*. 1997;278(5341):1295-300. PubMed PMID: 9360927.
2. Wong JK, Hezareh M, Gunthard HF, Havlir DV, Ignacio CC, Spina CA, et al. Recovery of replication-competent HIV despite prolonged suppression of plasma viremia. *Science*. 1997;278(5341):1291-5. PubMed PMID: 9360926.
3. Chun TW, Stuyver L, Mizell SB, Ehler LA, Mican JA, Baseler M, et al. Presence of an inducible HIV-1 latent reservoir during highly active antiretroviral therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94(24):13193-7. PubMed PMID: 9371822.
4. Deeks SG, Lewin SR, Ross AL, Ananworanich J, Benkirane M, Cannon P, et al. International AIDS Society global scientific strategy: towards an HIV cure 2016. *Nat Med*. 2016;22(8):839-50. doi: 10.1038/nm.4108. PubMed PMID: 27400264; PubMed Central PMCID: PMC5322797.
5. Chun TW, Engel D, Berrey MM, Shea T, Corey L, Fauci AS. Early establishment of a pool of latently infected, resting CD4(+) T cells during primary HIV-1 infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95(15):8869-73. Epub 1998/07/22. PubMed PMID: 9671771.
6. Colby DJ, Trautmann L, Pinyakorn S, Leyre L, Pagliuzza A, Kroon E, et al. Rapid HIV RNA rebound after antiretroviral treatment interruption in persons durably suppressed in Fiebig I acute HIV infection. *Nat Med*. 2018. Epub 2018/06/13. doi: 10.1038/s41591-018-0026-6. PubMed PMID: 29892063.
7. Strain MC, Little SJ, Daar ES, Havlir DV, Gunthard HF, Lam RY, et al. Effect of treatment, during primary infection, on establishment and clearance of cellular reservoirs of HIV-1. *J Infect Dis*. 2005;191(9):1410-8. PubMed PMID: 15809898.
8. Finzi D, Blankson J, Siliciano JD, Margolick JB, Chadwick K, Pierson T, et al. Latent infection of CD4+ T cells provides a mechanism for lifelong persistence of HIV-1, even in patients on effective combination therapy. *Nat Med*. 1999;5(5):512-7. PubMed PMID: 10229227.
9. Siliciano JD, Kajdas J, Finzi D, Quinn TC, Chadwick K, Margolick JB, et al. Long-term follow-up studies confirm the stability of the latent reservoir for HIV-1 in resting CD4+ T cells. *Nat Med*. 2003;9(6):727-8. PubMed PMID: 12754504.
10. Crooks AM, Bateson R, Cope AB, Dahl NP, Griggs MK, Kuruc JD, et al. Precise Quantitation of the Latent HIV-1 Reservoir: Implications for Eradication Strategies. *J Infect Dis*. 2015;212(9):1361-5. doi: 10.1093/infdis/jiv218. PubMed PMID: 25877550; PubMed Central PMCID: PMC4601910.
11. Perreau M, Banga R, Pantaleo G. Targeted Immune Interventions for an HIV-1 Cure. *Trends Mol Med*. 2017;23(10):945-61. Epub 2017/09/12. doi: 10.1016/j.molmed.2017.08.006. PubMed PMID: 28890135.

12. Descours B, Petitjean G, Lopez-Zaragoza JL, Bruel T, Raffel R, Psomas C, et al. CD32a is a marker of a CD4 T-cell HIV reservoir harboring replication-competent proviruses. *Nature*. 2017;543(7646):564-7. Epub 2017/03/16. doi: 10.1038/nature21710. PubMed PMID: 28297712.
13. Abdel-Mohsen M, Kuri-Cervantes L, Grau-Exposito J, Spivak AM, Nell RA, Tomescu C, et al. CD32 is expressed on cells with transcriptionally active HIV but does not enrich for HIV DNA in resting T cells. *Sci Transl Med*. 2018;10(437). Epub 2018/04/20. doi: 10.1126/scitranslmed.aar6759. PubMed PMID: 29669853.
14. Grau-Exposito J, Serra-Peinado C, Miguel L, Navarro J, Curran A, Burgos J, et al. A Novel Single-Cell FISH-Flow Assay Identifies Effector Memory CD4(+) T cells as a Major Niche for HIV-1 Transcription in HIV-Infected Patients. *MBio*. 2017;8(4). Epub 2017/07/13. doi: 10.1128/mBio.00876-17. PubMed PMID: 28698276; PubMed Central PMCID: PMC5513707.
15. Badia R, Ballana E, Castellvi M, Garcia-Vidal E, Pujantell M, Clotet B, et al. CD32 expression is associated to T-cell activation and is not a marker of the HIV-1 reservoir. *Nature communications*. 2018;9(1):2739. Epub 2018/07/18. doi: 10.1038/s41467-018-05157-w. PubMed PMID: 30013105; PubMed Central PMCID: PMC6048139.
16. Perez L, Anderson J, Chipman J, Thorkelson A, Chun TW, Moir S, et al. Conflicting evidence for HIV enrichment in CD32(+) CD4 T cells. *Nature*. 2018;561(7723):E9-E16. Epub 2018/09/21. doi: 10.1038/s41586-018-0493-4. PubMed PMID: 30232423.
17. Osuna CE, Lim SY, Kublin JL, Apps R, Chen E, Mota TM, et al. Evidence that CD32a does not mark the HIV-1 latent reservoir. *Nature*. 2018;561(7723):E20-E8. Epub 2018/09/21. doi: 10.1038/s41586-018-0495-2. PubMed PMID: 30232424.
18. Bertagnolli LN, White JA, Simonetti FR, Beg SA, Lai J, Tomescu C, et al. The role of CD32 during HIV-1 infection. *Nature*. 2018;561(7723):E17-E9. Epub 2018/09/21. doi: 10.1038/s41586-018-0494-3. PubMed PMID: 30232425.
19. McGary CS, Deleage C, Harper J, Micci L, Ribeiro SP, Paganini S, et al. CTLA-4(+)PD-1(-) Memory CD4(+) T Cells Critically Contribute to Viral Persistence in Antiretroviral Therapy-Suppressed, SIV-Infected Rhesus Macaques. *Immunity*. 2017;47(4):776-88 e5. Epub 2017/10/19. doi: 10.1016/j.immuni.2017.09.018. PubMed PMID: 29045906; PubMed Central PMCID: PMC5679306.
20. Hogan LE, Vasquez J, Hobbs KS, Hanhauser E, Aguilar-Rodriguez B, Hussien R, et al. Increased HIV-1 transcriptional activity and infectious burden in peripheral blood and gut-associated CD4+ T cells expressing CD30. *PLoS Pathog*. 2018;14(2):e1006856. Epub 2018/02/23. doi: 10.1371/journal.ppat.1006856. PubMed PMID: 29470552; PubMed Central PMCID: PMC5823470.
21. Fromentin R, Bakeman W, Lawani MB, Khoury G, Hartogensis W, DaFonseca S, et al. CD4+ T Cells Expressing PD-1, TIGIT and LAG-3 Contribute to HIV Persistence during ART. *PLoS Pathog*.

2016;12(7):e1005761. doi: 10.1371/journal.ppat.1005761. PubMed PMID: 27415008; PubMed Central PMCID: PMC4944956.

22. Iglesias-Ussel M, Vandergeeten C, Marchionni L, Chomont N, Romerio F. High levels of CD2 expression identify HIV-1 latently infected resting memory CD4⁺ T cells in virally suppressed subjects. *J Virol*. 2013;87(16):9148-58. doi: 10.1128/JVI.01297-13. PubMed PMID: 23760244; PubMed Central PMCID: PMC3754042.

23. Tran TA, de Goer de Herve MG, Hendel-Chavez H, Dembele B, Le Nevot E, Abbed K, et al. Resting regulatory CD4 T cells: a site of HIV persistence in patients on long-term effective antiretroviral therapy. *PLoS One*. 2008;3(10):e3305. doi: 10.1371/journal.pone.0003305. PubMed PMID: 18827929; PubMed Central PMCID: PMC2551739.

24. Perreau M, Savoye AL, De Crignis E, Corpataux JM, Cubas R, Haddad EK, et al. Follicular helper T cells serve as the major CD4 T cell compartment for HIV-1 infection, replication, and production. *J Exp Med*. 2013;210(1):143-56. doi: 10.1084/jem.20121932. PubMed PMID: 23254284; PubMed Central PMCID: PMC3549706.

25. Banga R, Procopio FA, Noto A, Pollakis G, Cavassini M, Ohmiti K, et al. PD-1(+) and follicular helper T cells are responsible for persistent HIV-1 transcription in treated aviremic individuals. *Nat Med*. 2016;22(7):754-61. doi: 10.1038/nm.4113. PubMed PMID: 27239760.

26. 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. doi: 10.1097/QAD.0000000000001309. PubMed PMID: 27835617; PubMed Central PMCID: PMC5131694.

27. 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):1604-16. doi: 10.4049/jimmunol.0903058. PubMed PMID: 20042588; PubMed Central PMCID: PMC4321756.

28. Massanella M, Richman DD. Measuring the latent reservoir in vivo. *J Clin Invest*. 2016;126(2):464-72. Epub 2016/02/02. doi: 10.1172/JCI80567. PubMed PMID: 26829625; PubMed Central PMCID: PMC4731179.

29. Plantin J, Massanella M, Chomont N. Inducible HIV RNA transcription assays to measure HIV persistence: pros and cons of a compromise. *Retrovirology*. 2018;15(1):9. Epub 2018/01/19. doi: 10.1186/s12977-017-0385-y. PubMed PMID: 29343255; PubMed Central PMCID: PMC5773137.

30. Ho Y-C, Shan L, Hosmane NN, Wang J, Laskey SB, Rosenbloom DIS, et al. Replication-Competent Noninduced Proviruses in the Latent Reservoir Increase Barrier to HIV-1 Cure. *Cell*. 2013;155(3):540-51.

31. Eriksson S, Graf EH, Dahl V, Strain MC, Yukl SA, Lysenko ES, et al. Comparative analysis of measures of viral reservoirs in HIV-1 eradication studies. *PLoS Pathog.* 2013;9(2):e1003174. doi: 10.1371/journal.ppat.1003174. PubMed PMID: 23459007; PubMed Central PMCID: PMC3573107.
32. Bruner KM, Murray AJ, Pollack RA, Soliman MG, Laskey SB, Capoferri AA, et al. Defective proviruses rapidly accumulate during acute HIV-1 infection. *Nat Med.* 2016;22(9):1043-9. Epub 2016/08/09. doi: 10.1038/nm.4156. PubMed PMID: 27500724; PubMed Central PMCID: PMC5014606.
33. Yukl SA, Kaiser P, Kim P, Telwatte S, Joshi SK, Vu M, et al. HIV latency in isolated patient CD4(+) T cells may be due to blocks in HIV transcriptional elongation, completion, and splicing. *Sci Transl Med.* 2018;10(430). Epub 2018/03/02. doi: 10.1126/scitranslmed.aap9927. PubMed PMID: 29491188.
34. Procopio FA, Fromentin R, Kulpa DA, Brehm JH, Bebin AG, Strain MC, et al. A Novel Assay to Measure the Magnitude of the Inducible Viral Reservoir in HIV-infected Individuals. *EBioMedicine.* 2015;2(8):872-81. doi: 10.1016/j.ebiom.2015.06.019. PubMed PMID: 26425694; PubMed Central PMCID: PMC5014606.
35. Imamichi H, Dewar RL, Adelsberger JW, Rehm CA, O'Doherty U, Paxinos EE, et al. Defective HIV-1 proviruses produce novel protein-coding RNA species in HIV-infected patients on combination antiretroviral therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2016;113(31):8783-8. Epub 2016/07/20. doi: 10.1073/pnas.1609057113. PubMed PMID: 27432972; PubMed Central PMCID: PMC5014606.
36. Bui JK, Mellors JW, Cillo AR. HIV-1 Virion Production from Single Inducible Proviruses following T-Cell Activation Ex Vivo. *J Virol.* 2016;90(3):1673-6. Epub 2015/11/13. doi: 10.1128/JVI.02520-15. PubMed PMID: 26559835; PubMed Central PMCID: PMC5014606.
37. Massanella M, Yek C, Lada SM, Nakazawa M, Shefa N, Huang K, et al. Improved assays to measure and characterize the inducible HIV reservoir. *EBioMedicine.* 2018. Epub 2018/10/15. doi: 10.1016/j.ebiom.2018.09.036. PubMed PMID: 30316868.
38. Chun TW, Carruth L, Finzi D, Shen X, DiGiuseppe JA, Taylor H, et al. Quantification of latent tissue reservoirs and total body viral load in HIV-1 infection. *Nature.* 1997;387(6629):183-8. PubMed PMID: 9144289.
39. Laird GM, Eisele EE, Rabi SA, Lai J, Chioma S, Blankson JN, et al. Rapid quantification of the latent reservoir for HIV-1 using a viral outgrowth assay. *PLoS Pathog.* 2013;9(5):e1003398. doi: 10.1371/journal.ppat.1003398. PubMed PMID: 23737751; PubMed Central PMCID: PMC3667757.
40. Hiener B, Horsburgh BA, Eden JS, Barton K, Schlub TE, Lee E, et al. Identification of Genetically Intact HIV-1 Proviruses in Specific CD4(+) T Cells from Effectively Treated Participants. *Cell reports.* 2017;21(3):813-22. Epub 2017/10/19. doi: 10.1016/j.celrep.2017.09.081. PubMed PMID: 29045846.

41. Graf EH, Pace MJ, Peterson BA, Lynch LJ, Chukwulebe SB, Mexas AM, et al. Gag-positive reservoir cells are susceptible to HIV-specific cytotoxic T lymphocyte mediated clearance in vitro and can be detected in vivo [corrected]. *PLoS One*. 2013;8(8):e71879. Epub 2013/08/21. doi: 10.1371/journal.pone.0071879. PubMed PMID: 23951263; PubMed Central PMCID: PMC3737195.
42. Pallikkuth S, Sharkey M, Babic DZ, Gupta S, Stone GW, Fischl MA, et al. Peripheral T Follicular Helper Cells Are the Major HIV Reservoir within Central Memory CD4 T Cells in Peripheral Blood from Chronically HIV-Infected Individuals on Combination Antiretroviral Therapy. *J Virol*. 2015;90(6):2718-28. Epub 2015/12/18. doi: 10.1128/JVI.02883-15. PubMed PMID: 26676775; PubMed Central PMCID: PMC4810658.
43. Gadol N, Crutcher GJ, Busch MP. Detection of intracellular HIV in lymphocytes by flow cytometry. *Cytometry*. 1994;15(4):359-70. doi: 10.1002/cyto.990150412. PubMed PMID: 8026226.
44. Kux A, Bertram S, Hufert FT, Schmitz H, von Laer D. Antibodies to p24 antigen do not specifically detect HIV-infected lymphocytes in AIDS patients. *J Immunol Methods*. 1996;191(2):179-86. PubMed PMID: 8666837.
45. Cameron PU, Hunter SD, Jolley D, Sonza S, Mijch A, Crowe SM. Specificity of binding of HIV-1 anti-p24 antibodies to CD4+ lymphocytes from HIV-infected subjects. *Cytometry*. 1998;33(1):83-8. PubMed PMID: 9725562.
46. Baxter AE, Niessl J, Fromentin R, Richard J, Porichis F, Charlebois R, et al. Single-Cell Characterization of Viral Translation-Competent Reservoirs in HIV-Infected Individuals. *Cell Host Microbe*. 2016;20(3):368-80. doi: 10.1016/j.chom.2016.07.015. PubMed PMID: 27545045; PubMed Central PMCID: PMC5025389.
47. Martrus G, Niehrs A, Cornelis R, Rechten A, Garcia-Beltran W, Lutgehetmann M, et al. Kinetics of HIV-1 Latency Reversal Quantified on the Single-Cell Level Using a Novel Flow-Based Technique. *J Virol*. 2016;90(20):9018-28. Epub 2016/07/29. doi: 10.1128/JVI.01448-16. PubMed PMID: 27466424; PubMed Central PMCID: PMC5044848.
48. Levesque K, Finzi A, Binette J, Cohen EA. Role of CD4 receptor down-regulation during HIV-1 infection. *Curr HIV Res*. 2004;2(1):51-9. Epub 2004/04/01. PubMed PMID: 15053340.
49. Wildum S, Schindler M, Munch J, Kirchhoff F. Contribution of Vpu, Env, and Nef to CD4 down-modulation and resistance of human immunodeficiency virus type 1-infected T cells to superinfection. *J Virol*. 2006;80(16):8047-59. Epub 2006/07/29. doi: 10.1128/JVI.00252-06. PubMed PMID: 16873261; PubMed Central PMCID: PMC1563805.
50. DeMaster LK, Liu X, VanBelzen DJ, Trinite B, Zheng L, Agosto LM, et al. A Subset of CD4/CD8 Double-Negative T Cells Expresses HIV Proteins in Patients on Antiretroviral Therapy. *J Virol*. 2015;90(5):2165-79. doi: 10.1128/JVI.01913-15. PubMed PMID: 26537682.

51. Stevenson M, Stanwick TL, Dempsey MP, Lamonica CA. HIV-1 replication is controlled at the level of T cell activation and proviral integration. *The EMBO journal*. 1990;9(5):1551-60. PubMed PMID: 2184033.
52. Brunner T, Mogil RJ, LaFace D, Yoo NJ, Mahboubi A, Echeverri F, et al. Cell-autonomous Fas (CD95)/Fas-ligand interaction mediates activation-induced apoptosis in T-cell hybridomas. *Nature*. 1995;373(6513):441-4. Epub 1995/02/02. doi: 10.1038/373441a0. PubMed PMID: 7530336.
53. Dhein J, Walczak H, Baumler C, Debatin KM, Krammer PH. Autocrine T-cell suicide mediated by APO-1/(Fas/CD95). *Nature*. 1995;373(6513):438-41. Epub 1995/02/02. doi: 10.1038/373438a0. PubMed PMID: 7530335.
54. Patsoukis N, Weaver JD, Strauss L, Herbel C, Seth P, Boussiotis VA. Immunometabolic Regulations Mediated by Coinhibitory Receptors and Their Impact on T Cell Immune Responses. *Front Immunol*. 2017;8:330. Epub 2017/04/27. doi: 10.3389/fimmu.2017.00330. PubMed PMID: 28443090; PubMed Central PMCID: PMC5387055.
55. Brenchley JM, Hill BJ, Ambrozak DR, Price DA, Guenaga FJ, Casazza JP, et al. T-cell subsets that harbor human immunodeficiency virus (HIV) in vivo: implications for HIV pathogenesis. *J Virol*. 2004;78(3):1160-8. PubMed PMID: 14722271.
56. Oswald-Richter K, Grill SM, Shariat N, Leelawong M, Sundrud MS, Haas DW, et al. HIV infection of naturally occurring and genetically reprogrammed human regulatory T-cells. *PLoS Biol*. 2004;2(7):E198. Epub 2004/07/15. doi: 10.1371/journal.pbio.0020198. PubMed PMID: 15252446; PubMed Central PMCID: PMC449855.
57. Moreno-Fernandez ME, Zapata W, Blackard JT, Franchini G, Chougnet CA. Human regulatory T cells are targets for human immunodeficiency Virus (HIV) infection, and their susceptibility differs depending on the HIV type 1 strain. *J Virol*. 2009;83(24):12925-33. Epub 2009/10/16. doi: 10.1128/JVI.01352-09. PubMed PMID: 19828616; PubMed Central PMCID: PMC2786841.
58. Cicala C, Martinelli E, McNally JP, Goode DJ, Gopaul R, Hiatt J, et al. The integrin alpha4beta7 forms a complex with cell-surface CD4 and defines a T-cell subset that is highly susceptible to infection by HIV-1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009. Epub 2009/11/26. doi: 0911796106 [pii] 10.1073/pnas.0911796106. PubMed PMID: 19933330.
59. Sivo A, Schuetz A, Sheward D, Joag V, Yegorov S, Liebenberg LJ, et al. Integrin alpha4beta7 expression on peripheral blood CD4(+) T cells predicts HIV acquisition and disease progression outcomes. *Sci Transl Med*. 2018;10(425). Epub 2018/01/26. doi: 10.1126/scitranslmed.aam6354. PubMed PMID: 29367348.
60. Chomont N, El-Far M, Ancuta P, Trautmann L, Procopio FA, Yassine-Diab B, et al. HIV reservoir size and persistence are driven by T cell survival and homeostatic proliferation. *Nat Med*. 2009;15(8):893-900. doi: 10.1038/nm.1972. PubMed PMID: 19543283; PubMed Central PMCID: PMC2859814.

61. Buzon MJ, Sun H, Li C, Shaw A, Seiss K, Ouyang Z, et al. HIV-1 persistence in CD4(+) T cells with stem cell-like properties. *Nat Med.* 2014;20(2):139-42. doi: 10.1038/nm.3445. PubMed PMID: 24412925.
62. Jaafoura S, de Goer de Herve MG, Hernandez-Vargas EA, Hendel-Chavez H, Abdoh M, Mateo MC, et al. Progressive contraction of the latent HIV reservoir around a core of less-differentiated CD4(+) memory T Cells. *Nature communications.* 2014;5:5407. doi: 10.1038/ncomms6407. PubMed PMID: 25382623; PubMed Central PMCID: PMC4241984.
63. Bruner KM, Hosmane NN, Siliciano RF. Towards an HIV-1 cure: measuring the latent reservoir. *Trends Microbiol.* 2015;23(4):192-203. Epub 2015/03/10. doi: 10.1016/j.tim.2015.01.013. PubMed PMID: 25747663; PubMed Central PMCID: PMC4386620.
64. Josefsson L, King MS, Makitalo B, Brannstrom J, Shao W, Maldarelli F, et al. Majority of CD4+ T cells from peripheral blood of HIV-1-infected individuals contain only one HIV DNA molecule. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108(27):11199-204. Epub 2011/06/22. doi: 10.1073/pnas.1107729108. PubMed PMID: 21690402; PubMed Central PMCID: PMC3131354.
65. Cohn LB, da Silva IT, Valieris R, Huang AS, Lorenzi JCC, Cohen YZ, et al. Clonal CD4(+) T cells in the HIV-1 latent reservoir display a distinct gene profile upon reactivation. *Nat Med.* 2018;24(5):604-9. Epub 2018/04/25. doi: 10.1038/s41591-018-0017-7. PubMed PMID: 29686423; PubMed Central PMCID: PMC5972543.
66. Weiss L, Chevalier MF, Assoumou L, Didier C, Girard PM, Piketty C, et al. T-cell activation positively correlates with cell-associated HIV-DNA level in viremic patients with primary or chronic HIV-1 infection. *AIDS.* 2014;28(11):1683-7. Epub 2014/05/21. doi: 10.1097/QAD.0000000000000319. PubMed PMID: 24841127.
67. Imbeault M, Giguere K, Ouellet M, Tremblay MJ. Exon level transcriptomic profiling of HIV-1-infected CD4(+) T cells reveals virus-induced genes and host environment favorable for viral replication. *PLoS Pathog.* 2012;8(8):e1002861. Epub 2012/08/10. doi: 10.1371/journal.ppat.1002861. PubMed PMID: 22876188; PubMed Central PMCID: PMC3410884.
68. Groot F, van Capel TM, Schuitemaker J, Berkhout B, de Jong EC. Differential susceptibility of naive, central memory and effector memory T cells to dendritic cell-mediated HIV-1 transmission. *Retrovirology.* 2006;3:52. doi: 10.1186/1742-4690-3-52. PubMed PMID: 16916447; PubMed Central PMCID: PMC1562438.
69. Shan L, Deng K, Gao H, Xing S, Capoferri AA, Durand CM, et al. Transcriptional Reprogramming during Effector-to-Memory Transition Renders CD4(+) T Cells Permissive for Latent HIV-1 Infection. *Immunity.* 2017;47(4):766-75 e3. Epub 2017/10/19. doi: 10.1016/j.immuni.2017.09.014. PubMed PMID: 29045905; PubMed Central PMCID: PMC5948104.

70. 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). Epub 2017/08/05. doi: 10.1172/jci.insight.93230. PubMed PMID: 28768913; PubMed Central PMCID: PMC5543920.
71. Locci M, Havenar-Daughton C, Landais E, Wu J, Kroenke MA, Arlehamn CL, et al. Human circulating PD-1+CXCR3-CXCR5+ memory Tfh cells are highly functional and correlate with broadly neutralizing HIV antibody responses. *Immunity*. 2013;39(4):758-69. doi: 10.1016/j.immuni.2013.08.031. PubMed PMID: 24035365; PubMed Central PMCID: PMC3996844.
72. Kader M, Wang X, Piatak M, Lifson J, Roederer M, Veazey R, et al. Alpha4(+)-beta7(hi)CD4(+) memory T cells harbor most Th-17 cells and are preferentially infected during acute SIV infection. *Mucosal immunology*. 2009;2(5):439-49. Epub 2009/07/03. doi: 10.1038/mi.2009.90. PubMed PMID: 19571800; PubMed Central PMCID: PMC2763371.
73. Engelhardt B, Conley FK, Kilshaw PJ, Butcher EC. Lymphocytes infiltrating the CNS during inflammation display a distinctive phenotype and bind to VCAM-1 but not to MAdCAM-1. *International immunology*. 1995;7(3):481-91. Epub 1995/03/01. PubMed PMID: 7540864.
74. DeNucci CC, Shimizu Y. beta1 integrin is critical for the maintenance of antigen-specific CD4 T cells in the bone marrow but not long-term immunological memory. *J Immunol*. 2011;186(7):4019-26. Epub 2011/03/02. doi: 10.4049/jimmunol.1003566. PubMed PMID: 21357540; PubMed Central PMCID: PMC3062718.
75. Mittelbrunn M, Molina A, Escribese MM, Yanez-Mo M, Escudero E, Ursa A, et al. VLA-4 integrin concentrates at the peripheral supramolecular activation complex of the immune synapse and drives T helper 1 responses. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(30):11058-63. Epub 2004/07/21. doi: 10.1073/pnas.0307927101. PubMed PMID: 15263094; PubMed Central PMCID: PMC503740.
76. Schriever F, Korinth D, Salahi A, Lefterova P, Schmidt-Wolf IG, Behr SI. Human T lymphocytes bind to germinal centers of human tonsils via integrin alpha4/VCAM-1 and LFA-1/ICAM-1 and -2. *Eur J Immunol*. 1997;27(1):35-9. Epub 1997/01/01. doi: 10.1002/eji.1830270106. PubMed PMID: 9021995.
77. Lobb RR, Hemler ME. The pathophysiologic role of alpha 4 integrins in vivo. *J Clin Invest*. 1994;94(5):1722-8. Epub 1994/11/01. doi: 10.1172/JCI117519. PubMed PMID: 7525645; PubMed Central PMCID: PMC294562.
78. Hellerstein MK, Hoh RA, Hanley MB, Cesar D, Lee D, Neese RA, et al. Subpopulations of long-lived and short-lived T cells in advanced HIV-1 infection. *J Clin Invest*. 2003;112(6):956-66. doi: 10.1172/JCI17533. PubMed PMID: 12975480; PubMed Central PMCID: PMC193663.
79. Wagner R, Graf M, Bieler K, Wolf H, Grunwald T, Foley P, et al. Rev-independent expression of synthetic gag-pol genes of human immunodeficiency virus type 1 and simian immunodeficiency

virus: implications for the safety of lentiviral vectors. *Hum Gene Ther.* 2000;11(17):2403-13. Epub 2000/11/30. doi: 10.1089/104303400750038507. PubMed PMID: 11096444.

80. Blissenbach M, Grewe B, Hoffmann B, Brandt S, Uberla K. Nuclear RNA export and packaging functions of HIV-1 Rev revisited. *J Virol.* 2010;84(13):6598-604. Epub 2010/04/30. doi: 10.1128/JVI.02264-09. PubMed PMID: 20427541; PubMed Central PMCID: PMCPMC2903257.

81. Estes JD, Kityo C, Ssali F, Swainson L, Makamdop KN, Del Prete GQ, et al. Defining total-body AIDS-virus burden with implications for curative strategies. *Nat Med.* 2017;23(11):1271-6. Epub 2017/10/03. doi: 10.1038/nm.4411. PubMed PMID: 28967921; PubMed Central PMCID: PMCPMC5831193.

82. Chomont N, Perreau M. Strategies for targeting residual HIV infection. *Curr Opin HIV AIDS.* 2016;11(4):359-61. doi: 10.1097/COH.0000000000000291. PubMed PMID: 27259044; PubMed Central PMCID: PMCPMC4913693.

83. Vandergeeten C, Fromentin R, Merlini E, Lawani MB, DaFonseca S, Bakeman W, et al. Cross-clade ultrasensitive PCR-based assays to measure HIV persistence in large-cohort studies. *J Virol.* 2014;88(21):12385-96. doi: 10.1128/JVI.00609-14. PubMed PMID: 25122785; PubMed Central PMCID: PMCPMC4248919.

84. Baxter AE, Niessl J, Fromentin R, Richard J, Porichis F, Massanella M, et al. Multiparametric characterization of rare HIV-infected cells using an RNA-flow FISH technique. *Nature protocols.* 2017;12(10):2029-49. Epub 2017/09/08. doi: 10.1038/nprot.2017.079. PubMed PMID: 28880280.

85. Bounou S, Leclerc JE, Tremblay MJ. Presence of host ICAM-1 in laboratory and clinical strains of human immunodeficiency virus type 1 increases virus infectivity and CD4(+)-T-cell depletion in human lymphoid tissue, a major site of replication in vivo. *J Virol.* 2002;76(3):1004-14. Epub 2002/01/05. PubMed PMID: 11773376.

86. Rosenbloom DI, Elliott O, Hill AL, Henrich TJ, Siliciano JM, Siliciano RF. Designing and Interpreting Limiting Dilution Assays: General Principles and Applications to the Latent Reservoir for Human Immunodeficiency Virus-1. *Open Forum Infect Dis.* 2015;2(4):ofv123. Epub 2015/10/20. doi: 10.1093/ofid/ofv123. PubMed PMID: 26478893; PubMed Central PMCID: PMCPMC4602119.

Fig 1

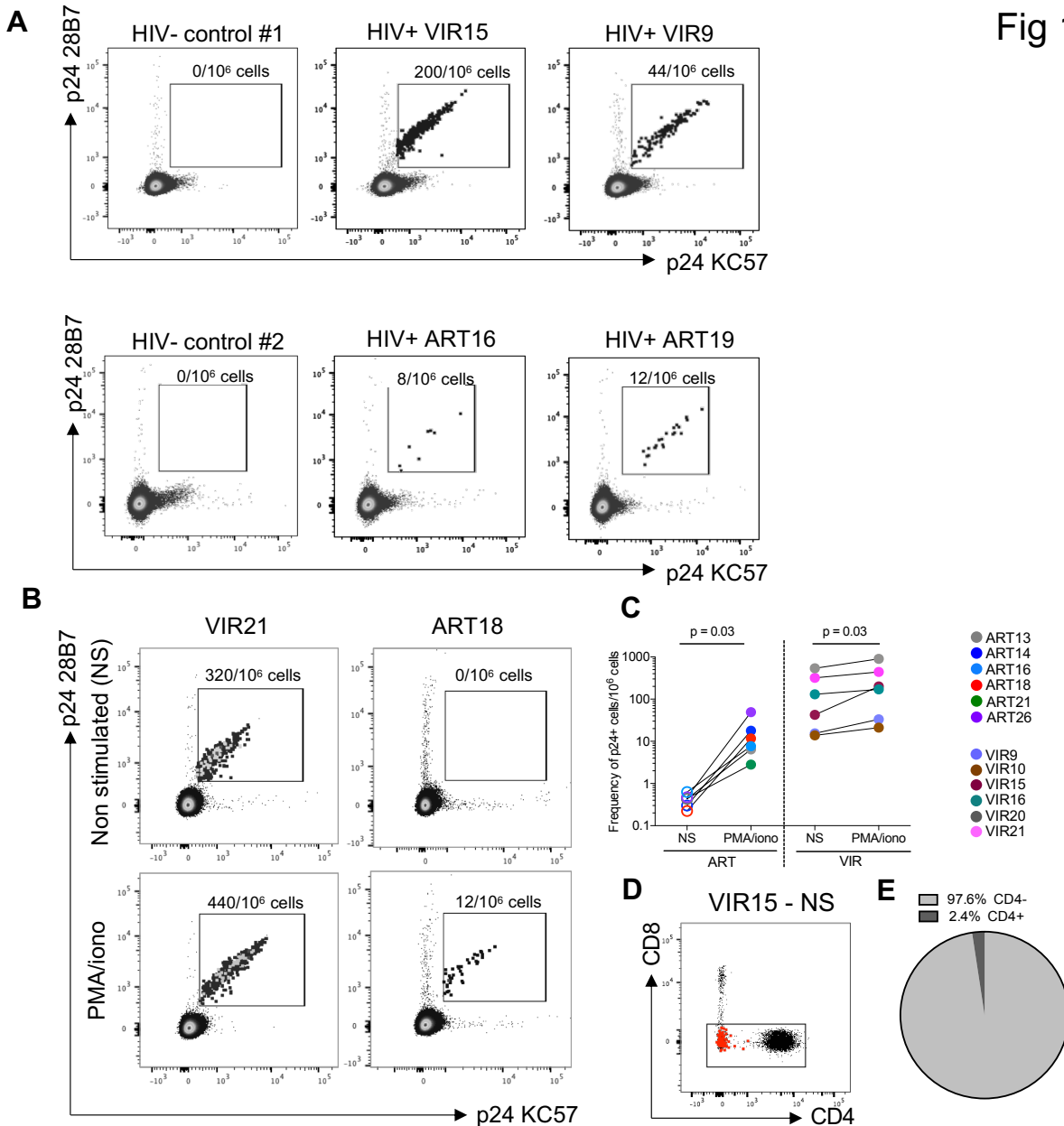


Fig 1. HIV-Flow allows the detection of p24-producing cells in samples from viremic and ART-suppressed individuals. (A) Representative dot plots showing the p24 KC57-PE/p24 28B7-APC co-staining in purified CD4+ T cells stimulated with PMA/ionomycin for 18h (viremic individuals) or 24h (ART-suppressed individuals). In each experiment, sample from an HIV-negative control was included. (B) Representative dot plots showing the detection of p24+ cells in the absence of stimulation (NS) or after PMA/ionomycin stimulation in samples from a viremic and an ART-suppressed individual. (C) Frequencies of p24+ cells in the absence of stimulation or following PMA/ionomycin stimulation in samples from 6 ART-suppressed individuals (VIR). Each sample is represented by a unique color-coded symbol. Undetectable measures are represented as opened symbols, and limits of detection are plotted. For statistical analyses, Wilcoxon matched-pairs signed rank test was performed. (D) Representative dot plot showing cell surface CD4 expression in p24+ cells (represented as red dots) obtained from a viremic individual. (E) Pie chart representing the average proportions of p24+ cells expressing CD4 on their surface in samples from 6 viremic individuals.

Fig 2

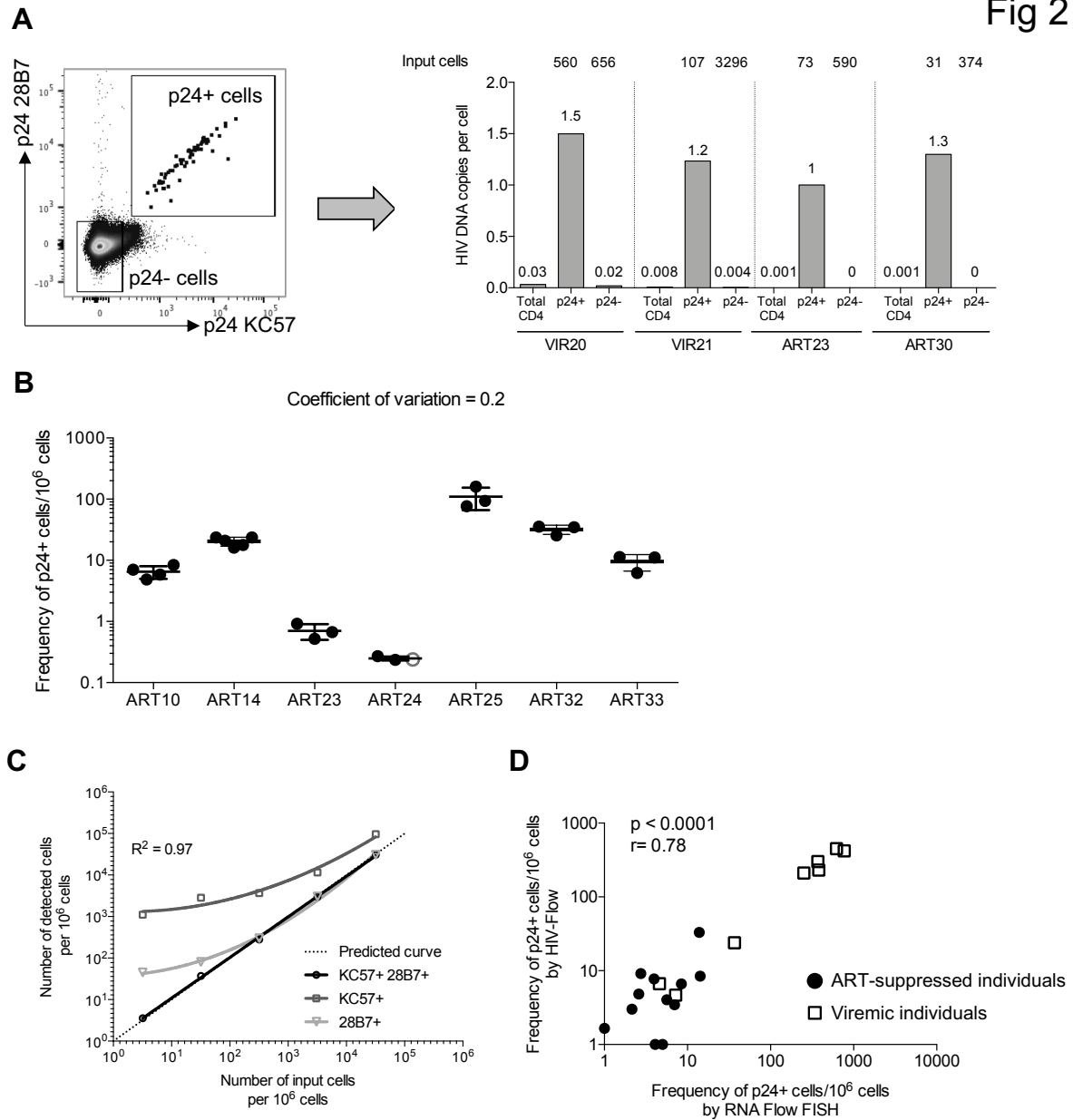


Fig 2. Specificity, sensitivity and reproducibility of HIV-Flow. (A) Representative dot plot showing the gating strategy used to sort p24+ and p24- cells following stimulation of CD4+ T cells with PMA/ionomycin (left). Total HIV DNA was quantified by ultrasensitive PCR in each sorted subset as well as in total unsorted CD4 T cells (right). (B) Repeated measures of the frequencies of p24+ cells from 7 ART-suppressed individuals in 2-5 independent experiments. Medians and interquartile ranges are shown. (C) Frequency of p24+ cells assessed by single staining p24 KC57 or p24 28B7, or by dual staining p24 KC57/p24 28B7 in *in vitro* infected CD4+ T cells spiked at different ratios in uninfected CD4+ T cells purified from an HIV uninfected individual. Predicted curve is represented by the dashed line. (D) Correlation between the frequency of p24+ cells assessed by HIV-Flow and the RNA Flow FISH assay. For statistical analyses, non-parametric Spearman correlation was performed.

Fig 3

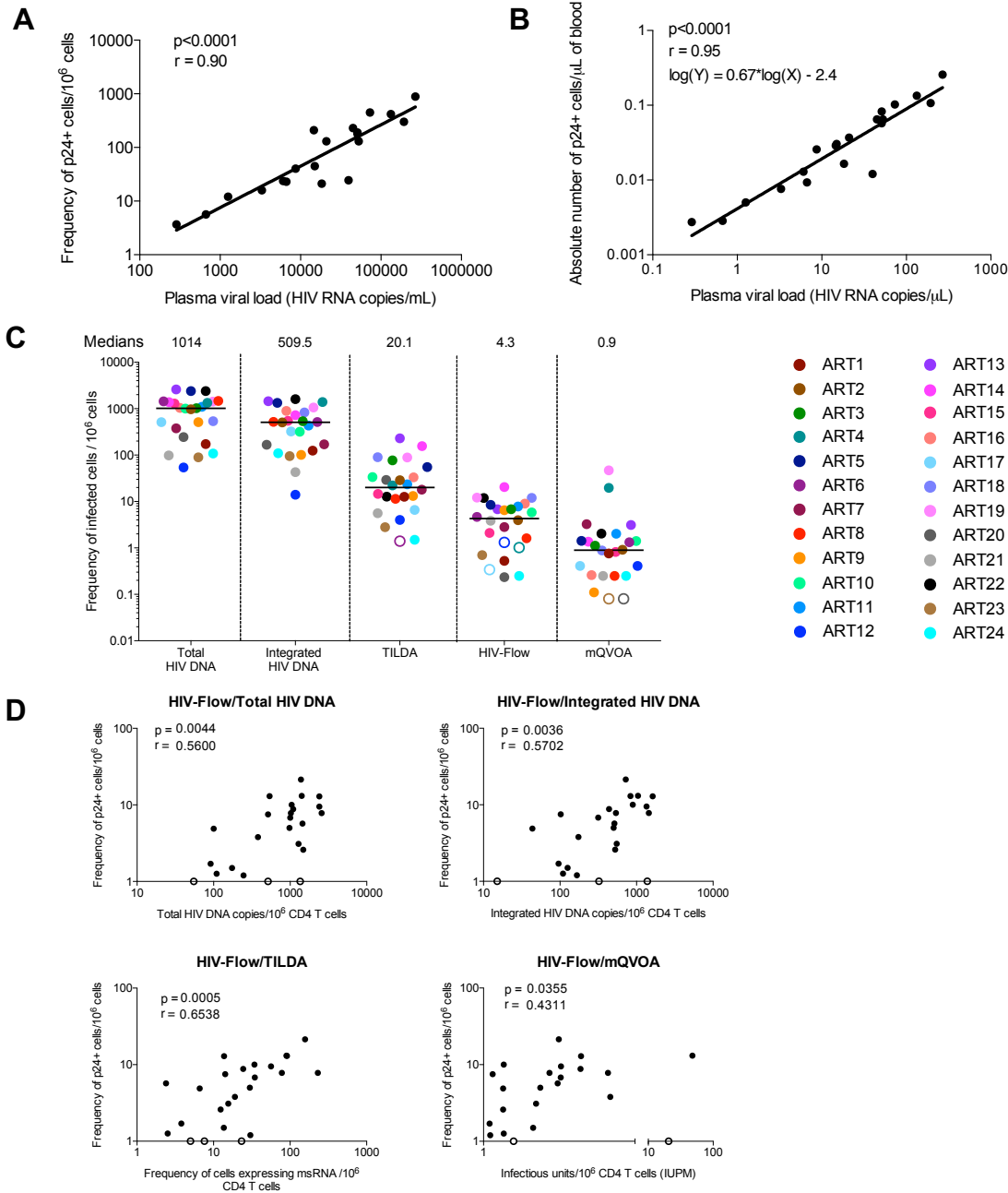
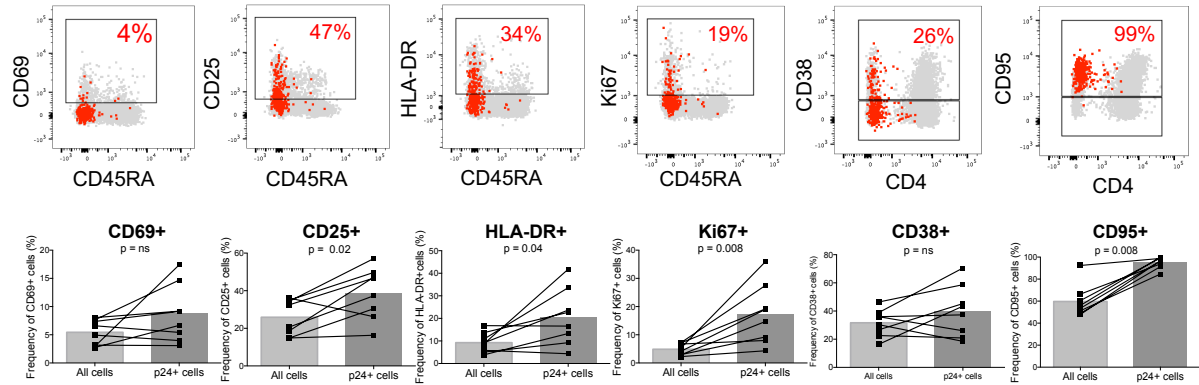


Fig 3. HIV-Flow correlates with other assays measuring the size of the HIV reservoir. (A) Correlation between plasma viral load and the frequency of p24+ cells in purified CD4 T cells from 20 chronically infected untreated individuals following stimulation with PMA/ionomycin. Data were log transformed and non-parametric Spearman correlation was used for statistical analyses. (B) Correlation between plasma viral load and the absolute number of p24+ cells per μ L of blood. Data were log transformed and a linear regression was performed between plasma viral load (HIV RNA copies/ μ L) and the absolute numbers of p24-producing cells per μ L of blood. (C) Frequencies of infected cells in samples from 24 ART-suppressed individuals were estimated using 5 different assays (total HIV DNA, integrated HIV DNA, TILDA, HIV-Flow, and mQVOA). Black lines represent medians. Each sample is represented by a unique color-coded symbol. Undetectable measurements are represented as open symbols, and limits of detection are plotted. (D) Correlations between the frequency of p24-producing cells assessed by HIV-Flow and other assays measuring the reservoirs size (total HIV DNA, integrated HIV DNA, TILDA and mQVOA). For statistical analyses, data were log transformed and non-parametric Spearman correlations were performed.

Fig 4

A



B

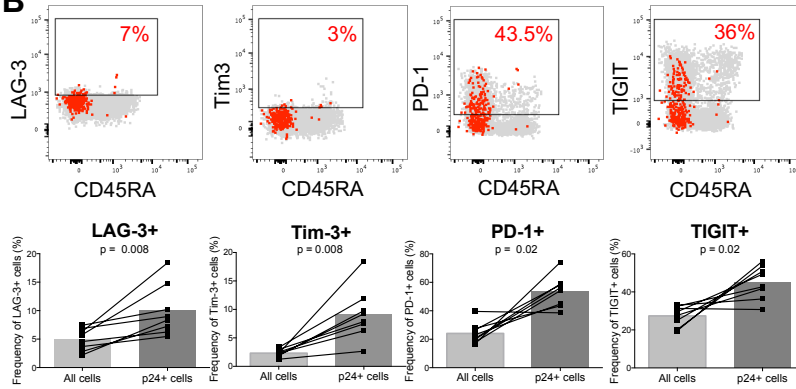


Fig 4. p24-producing cells from untreated individuals are enriched in subsets expressing markers of activation and exhaustion. Representative dot plots showing the phenotype of p24+ cells (represented as red dots) overlaid onto all cells (in grey) after 18h of resting. The contribution of a given subset to the pool of all cells and to the pool of infected cells (p24+) are compared in samples from n=8 untreated individuals (VIR9, 10, 12, 13, 15, 16, 20, 21). (A) Activation/proliferation/apoptosis markers: CD69, CD25, HLA-DR, Ki67, CD38, CD95. (B) Immune checkpoint molecules: LAG-3, Tim-3, PD-1, TIGIT. For statistical analyses, Wilcoxon matched-pairs signed rank test was performed.

Fig 5

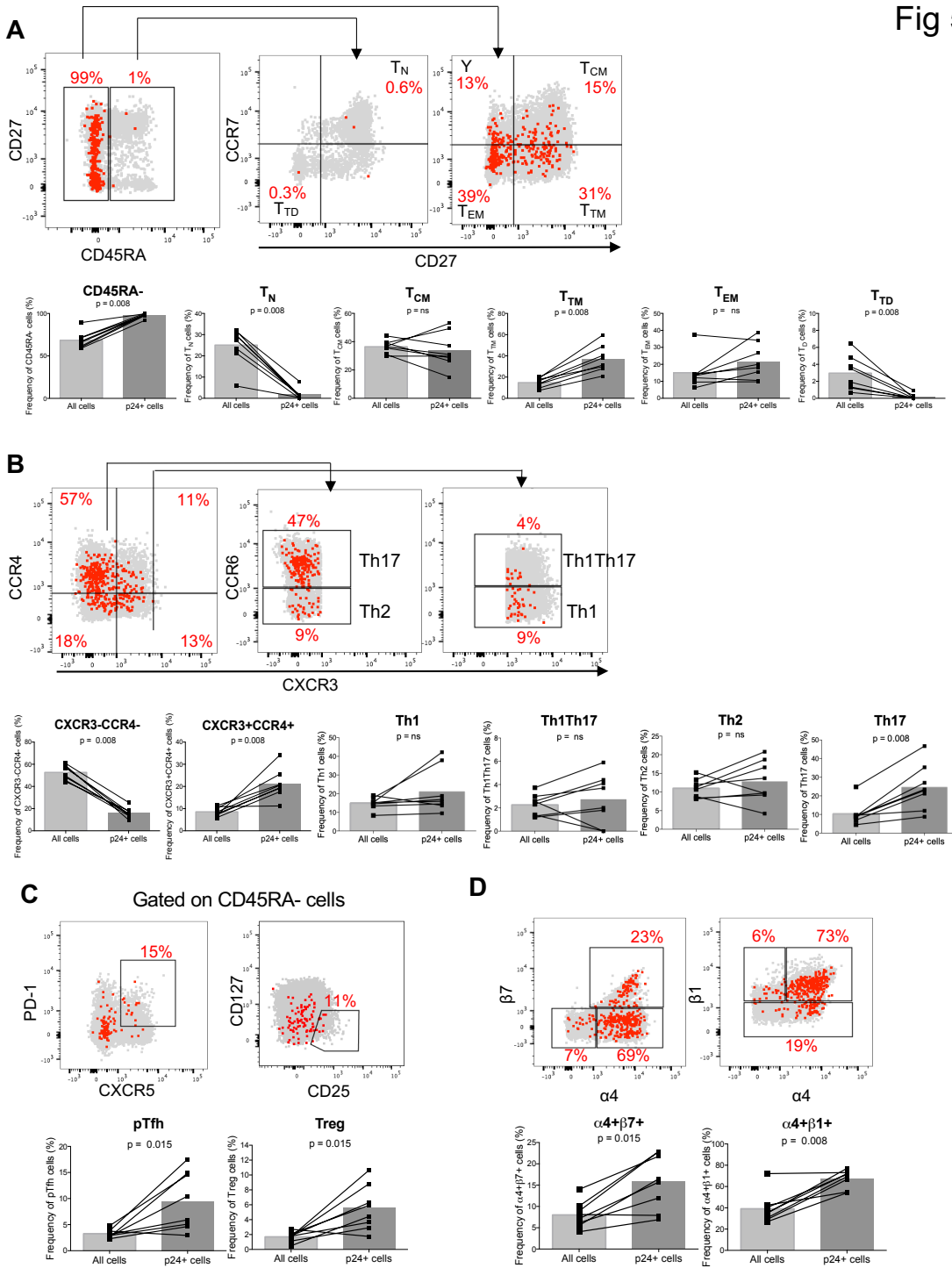


Fig 5. p24-producing cells from untreated individuals are enriched in various cell subsets. Representative dot plots showing the phenotype of p24⁺ cells (represented as red dots) overlaid onto all cells (in grey) after an 18h-resting. The contribution of a given subset to the pool of all cells and to the pool of infected cells (p24⁺) are compared in samples from n=8 untreated individuals (same as in Fig 4). (A) Memory phenotype: T_N, T_{CM}, T_{TM}, T_{EM} and T_{TD} cells. (B) CXCR3-CCR4⁻, CXCR3+CCR4⁺, Th1, Th2, Th17, and Th1Th17 cells. (C) pTfh and Treg cells. (D) Integrins: α4β7 and α4β1. For statistical analyses, Wilcoxon matched-pairs signed rank test was performed.

Fig 6

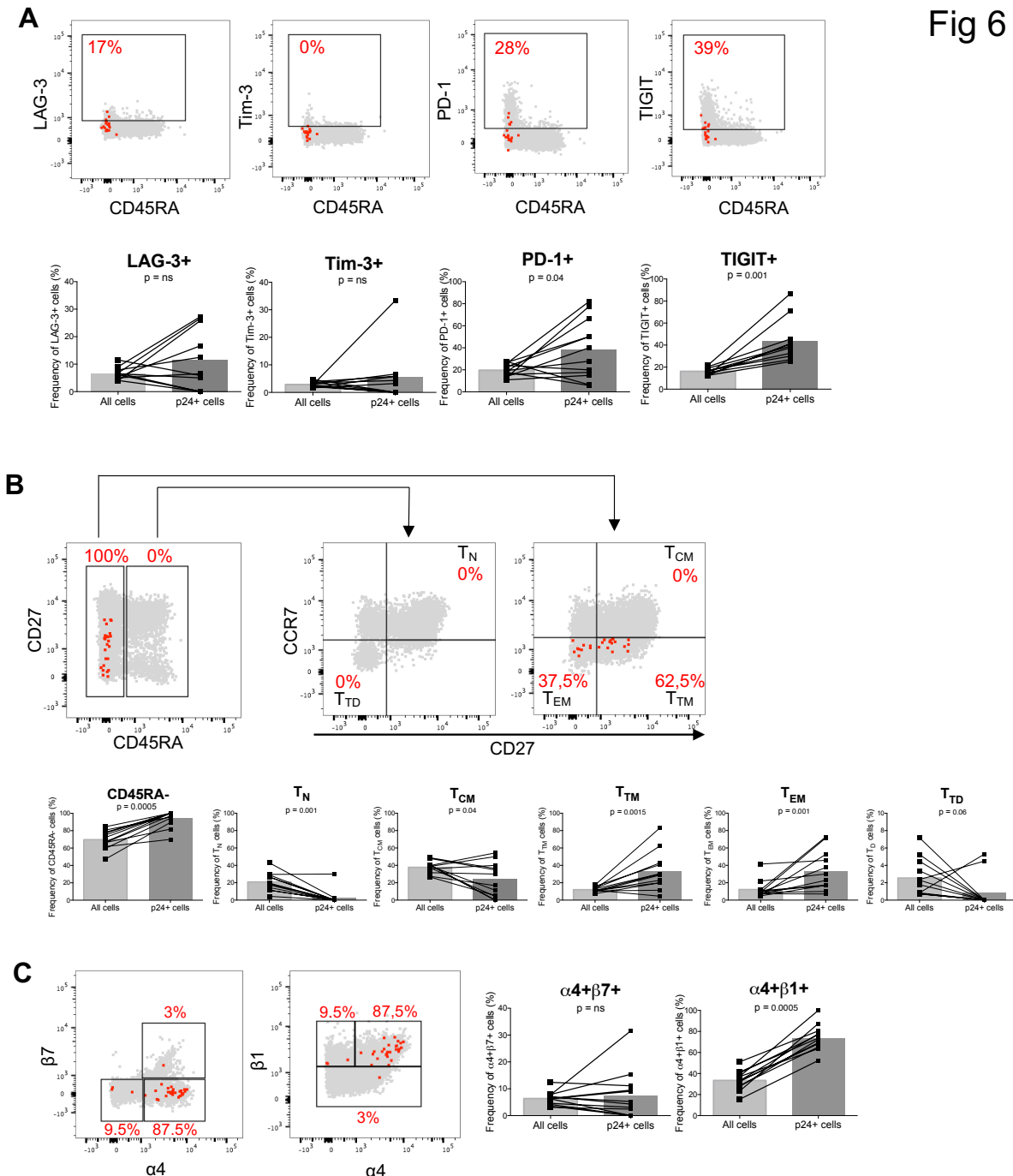


Fig 6. p24-producing cells from ART-suppressed individuals are enriched in T_{TM}/T_{EM}, PD-1+, TIGIT+ and α4β1+ cells. Representative dot plots showing the phenotype of p24+ cells represented as red dots overlaid onto all cells in grey. Purified CD4 T cells from 12 ART-suppressed individuals were stimulated with PMA/ionomycin for 24h before analysis. BFA was added 1h before PMA/ionomycin stimulation and was maintained until the end of the stimulation. The contribution of a given subset to the pool of all cells and to the pool of infected cells (p24+) are compared in samples from n=12 ART-suppressed individuals (ART5, 9, 10, 11, 14, 16, 18, 19, 21, 22, 27, 33). (A) Immune checkpoint molecules: LAG-3, Tim-3, PD-1, TIGIT. (B) Memory phenotype: T_N, T_{CM}, T_{TM}, T_{EM} and T_{TD} cells. (C) Integrins: α4β7 and α4β1. For statistical analyses, Wilcoxon matched-pairs signed rank test was performed.

Table 1

Table 1: Characteristics of viremic individuals

ID	Age (years)	Gender ¹	CD4 count (cells/ μ l)	CD4/CD8 Ratio	Viral Load (copies/mL)	Time since diagnosis (years)
VIR1	22	M	750	0.8	286	1.0
VIR2	46	M	504	0.7	667	7.3
VIR3	37	F	415	0.5	1256	5.0
VIR4	55	M	480	0.3	3300	5.7
VIR5	32	M	543	0.6	6077	N.A
VIR6	41	M	406	0.4	6671	22.6
VIR7	42	F	638	1.3	8700	7.6
VIR8	38	M	138	0.4	14614	11.0
VIR9	43	F	681	1.3	15000	8.2
VIR10	47	F	779	0.6	18320	13.5
VIR11	29	F	284	0.5	21000	5.3
VIR12	47	M	492	1.0	39489	8.5
VIR13	49	M	281	0.4	44848	7.3
VIR14	27	F	319	0.7	51000	12.0
VIR15	40	M	434	0.2	51000	2.5
VIR16	41	M	499	0.3	52915	N.A
VIR17	45	M	228	0.3	73109	10.3
VIR18	38	M	320	0.2	132886	0.4
VIR19	43	M	356	0.3	193437	1.9
VIR20	51	M	289	0.1	268432	13.1
VIR21*	34	M	688	0.2	366487	0.2
<i>Median</i>	41		434	0.4	21000	7.3
<i>IQ range</i>	[37-46]		[319-543]	[0.3-0.7]	[6671-52915]	[3.8-10.6]

¹Gender : F = female, M = male

N.A = not available

* acute stage of HIV infection and excluded from the analysis in Figure 3A

Table 2

Table 2: Characteristics of ART-suppressed individuals

ID	Age (years)	Gender ¹	CD4 count (cells/ μ l)	CD4/CD8 Ratio	Viral Load (copies/mL)	Time to ART initiation (years)	Time since diagnosis (years)	Time on ART (years)
ART1	35	M	1589	1.0	< 40	0.8	8.0	7.1
ART2	50	M	331	0.7	< 40	1.7	20.0	18.3
ART3	55	M	696	0.7	< 40	6.0	15.4	9.4
ART4	52	M	836	0.5	< 40	0.4	14.0	14.0
ART5	45	M	429	0.8	< 40	10.7	14.0	3.3
ART6	36	M	461	0.5	< 40	0.5	7.0	6.6
ART7	60	M	624	1.1	< 40	0.4	4.6	4.3
ART8	67	M	620	1.1	< 40	2.1	20.4	18.3
ART9	48	M	662	1.0	< 40	0.2	16.9	16.7
ART10	36	M	882	0.7	< 40	4.7	13.8	9.1
ART11	55	M	847	1.4	< 40	15.1	29.3	14.1
ART12	21	M	331	0.8	< 40	0.2	4.3	4.1
ART13	66	M	601	0.7	< 40	6.5	22.2	15.6
ART14	60	M	803	1.9	< 40	4.8	25.1	20.4
ART15	58	M	628	1.0	< 40	0.9	21.6	20.7
ART16	58	M	520	0.4	< 40	14.0	21.4	7.4
ART17	56	M	582	1.4	< 40	1.4	11.7	10.3
ART18	47	M	625	1.2	< 40	0.3	15.1	14.8
ART19	36	M	471	1.5	< 40	7.8	12.0	4.2
ART20	45	M	681	0.6	< 40	1.1	13.4	12.3
ART21	58	M	602	2.1	35.0	0.8	9.2	8.4
ART22	57	M	1173	1.0	< 20	0.6	20.7	20.1
ART23	33	M	1042	1.3	< 40	3.0	10.8	7.8
ART24	44	M	914	0.7	< 40	1.0	5.9	4.9
ART25	41	M	1177	1.3	< 50	N.A	9.3	N.A
ART26	60	M	677	0.9	< 20	N.A	N.A	N.A
ART27	46	M	887	0.8	< 20	2.0	18.3	16.3
ART28	46	F	527	0.3	< 20	1.0	7.4	6.4
ART29	43	F	351	1.0	< 41	11.7	15.4	3.7
ART30	32	M	734	1.0	< 20	4.9	7.4	2.5
ART31	50	M	1110	2.8	< 20	N.A	16.0	N.A
ART32	46	F	1030	0.9	< 20	N.A	18.6	N.A
ART33	56	M	715	1.0	140.0	N.A	27.6	N.A
ART34	46	M	1897	2.3	< 20	N.A	19.7	N.A
ART35	32	M	248	0.7	< 20	0.5	3.1	2.7
ART36	31	M	394	0.5	49.0	2.9	3.7	0.9
ART37	63	M	782	0.5	< 40	13.0	19.3	6.3
ART38	47	M	356	0.4	< 40	10.3	14.7	4.4
ART39	39	M	616	0.5	< 40	0.6	1.8	1.2
<i>Median</i>	47		662	0.9		1.7	14.4	7.8
<i>IQ range</i>	[40-57]		[524-	[0.7-1.2]		[0.6-6.0]	[8.3-19.6]	[4.3-14.8]

¹Gender : F = female, M = male
N.A = not available

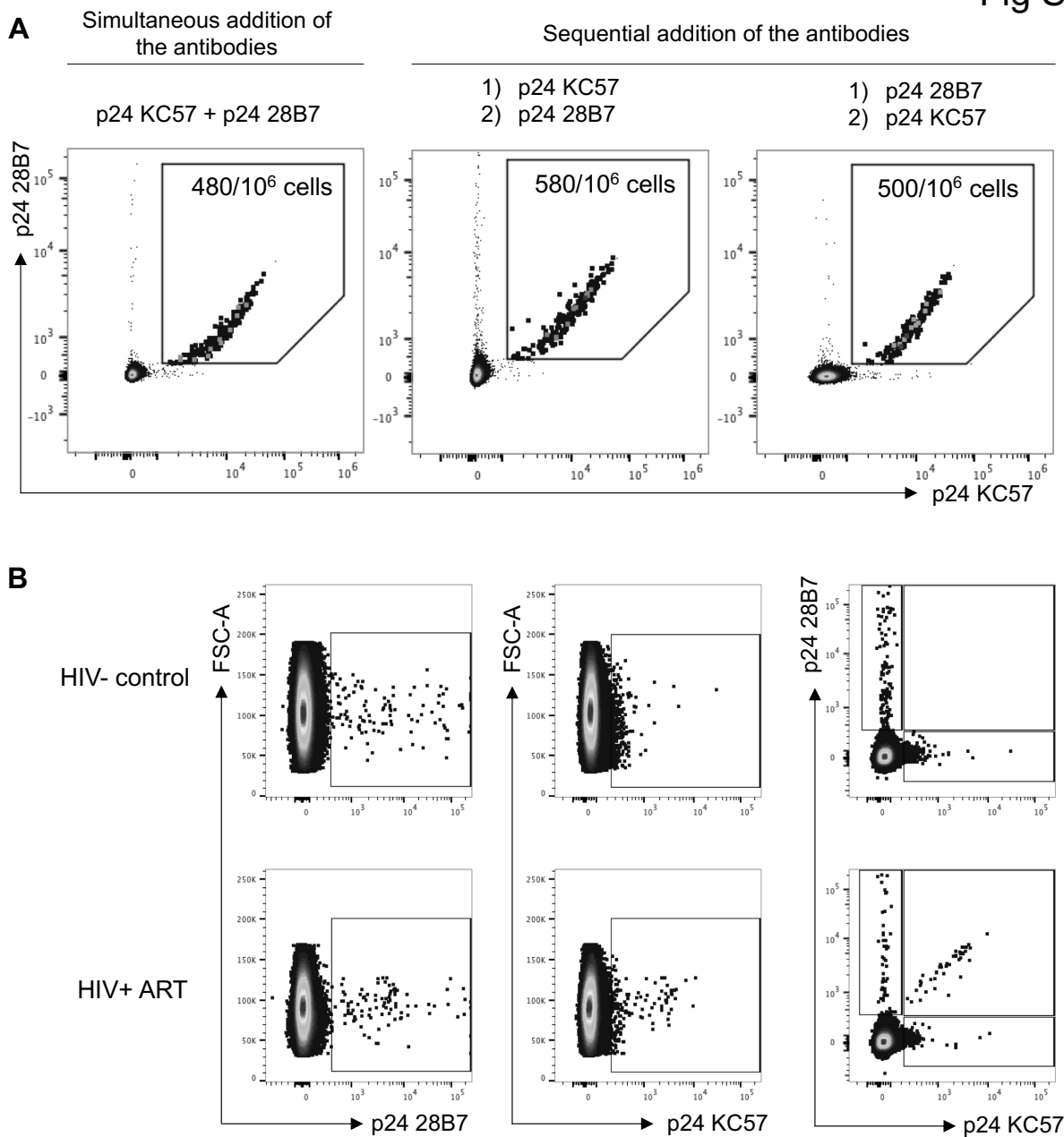


Fig S1. Characterization of p24 KC57 and p24 28B7 antibodies. (A) Representative dot plots obtained from a binding competition experiment. Staining with either KC57 or 28B7 in a first step (1) does not prevent subsequent staining with the other antibody (2) (middle and right panels). Co-staining with both antibodies yielded a similar frequency of p24+ cells (left panel). (B) Representative dot plots showing single stainings or co-staining with p24 KC57 and p24 28B7 antibodies in samples from an HIV negative control and an ART-suppressed individual.

Fig S2

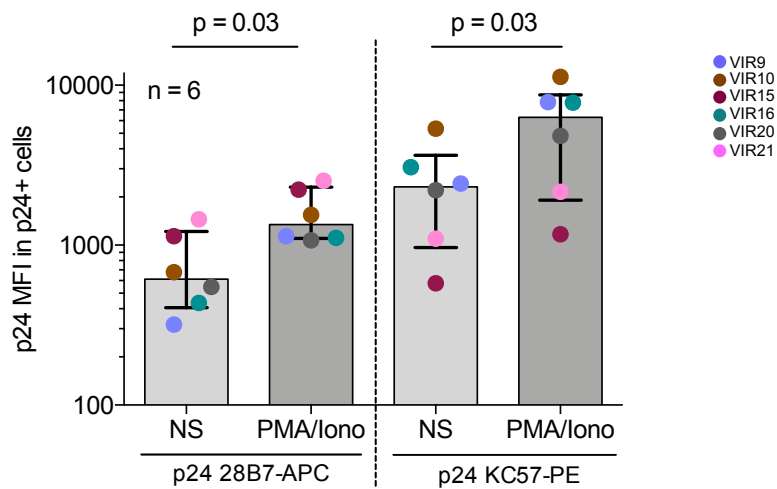


Fig S2. MFI of p24 antibodies following stimulation. Comparison of the MFI of the two p24 antibodies (p24 28B7-APC and p24 KC57-PE) in the presence or absence of stimulation with PMA/ionomycin in samples from 6 untreated individuals. The MFI of p24 antibodies was measured within the p24+ gate (p24 KC57+/p24 28B7+).

Fig S3

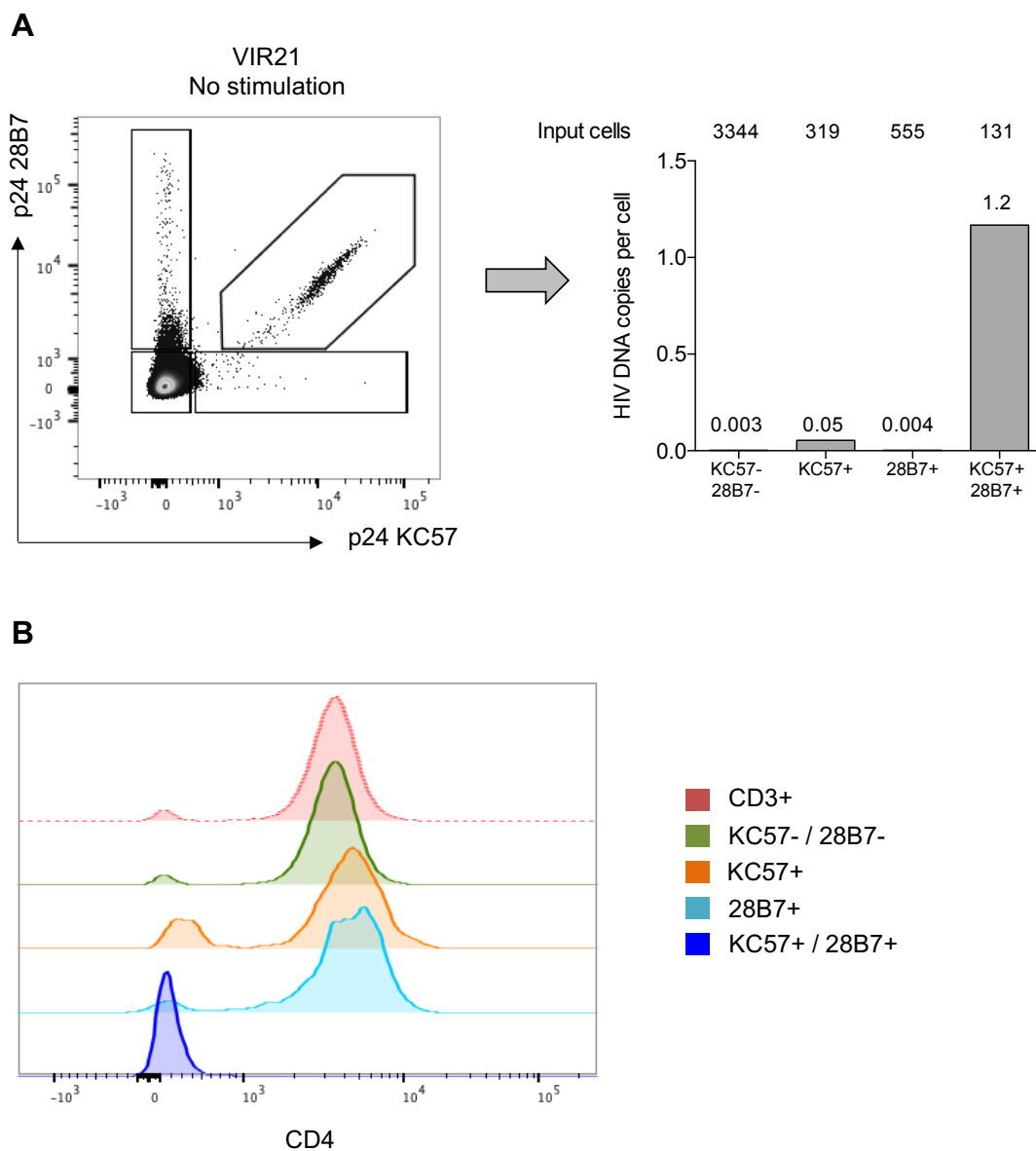


Fig S3. Single positive cells contain low HIV DNA levels. (A) Representative dot plot showing the gating strategy used to sort four populations of unstimulated cells (KC57+/28B7+, KC57+, 28B7+ and KC57-/28B7- cells) obtained from one untreated individual (VIR21). Total HIV DNA was quantified by ultrasensitive PCR in each sorted subset (right). (B) Levels of CD4 expression in the different subsets.

Fig S4

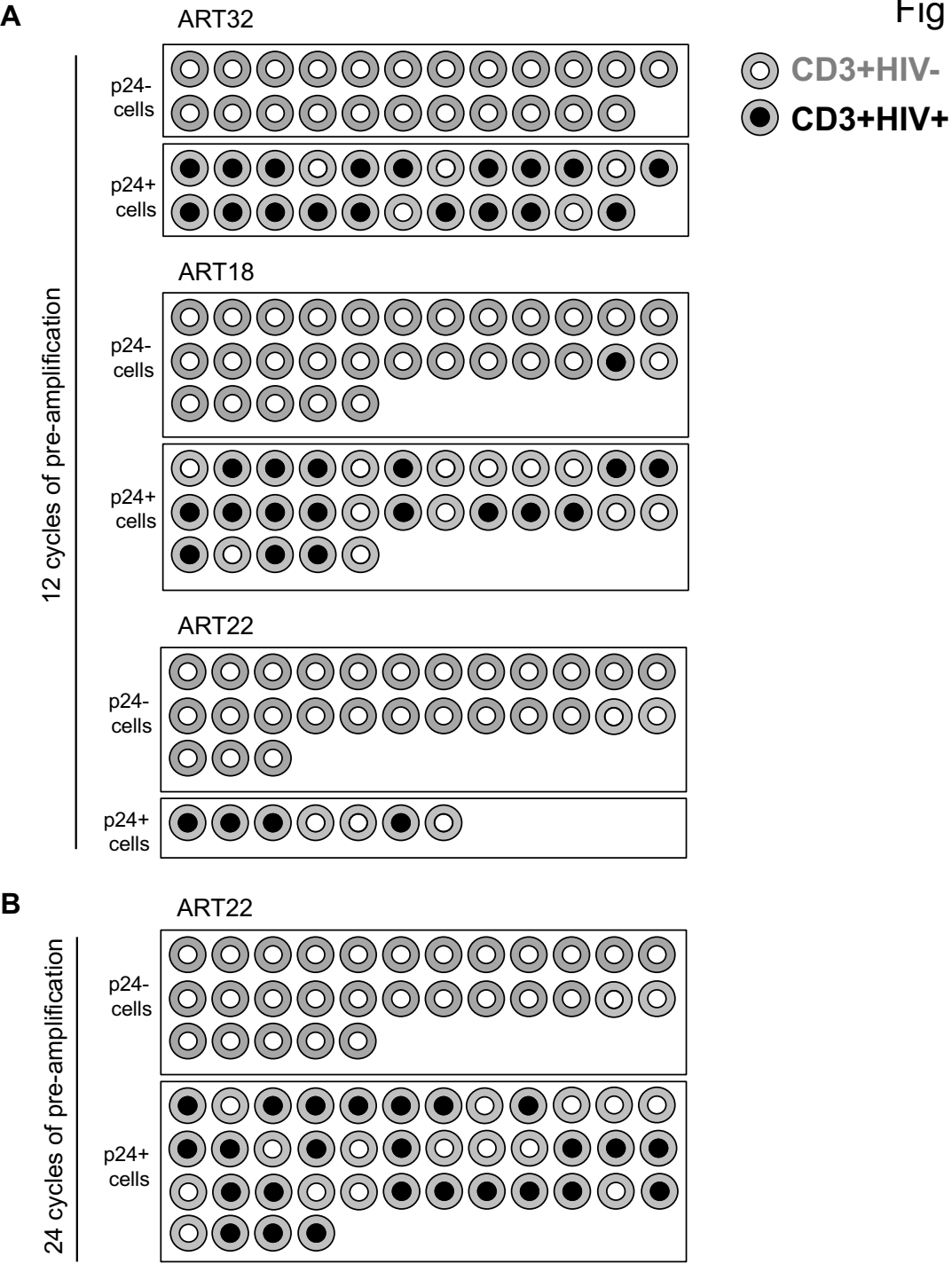
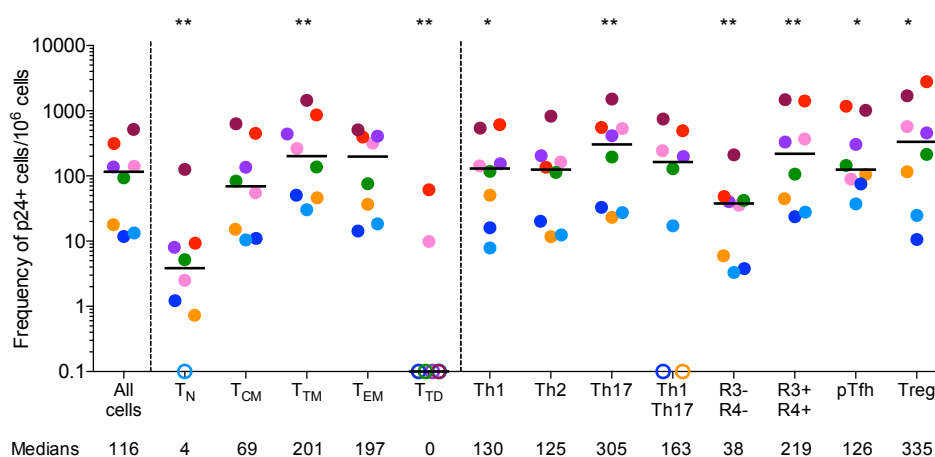
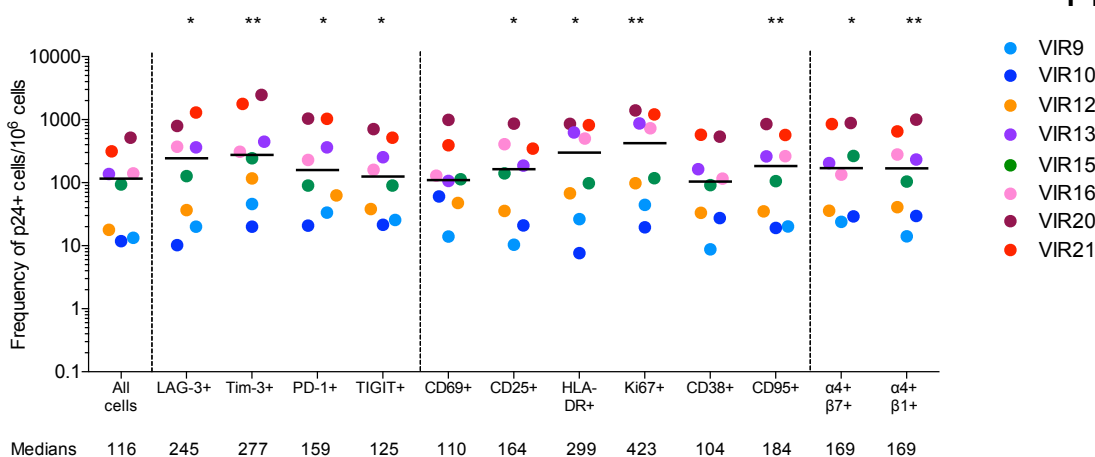


Fig S4. HIV DNA detection by PCR in p24+ single sorted cells. p24- and p24+ CD4 T cells from three ART-suppressed individuals were single sorted by flow cytometry and subjected to a duplex ultrasensitive PCR for the CD3 gene and the HIV genome (LTR/gag). Grey and dark circles represent successful detection of the CD3 gene and the HIV genome, respectively. A) 12 cycles of pre-PCR amplification were performed. B) 24 cycles of pre-PCR amplification were performed.

Fig S5

A Viremic individuals



B ART-suppressed individuals

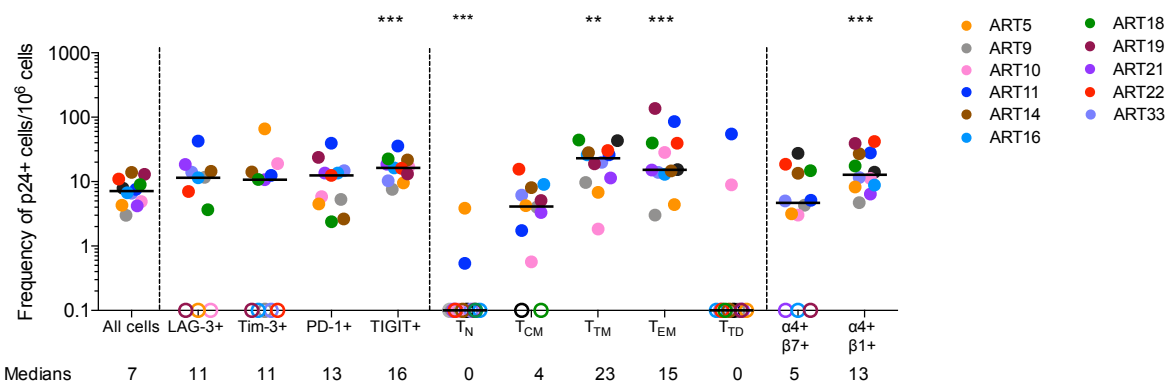
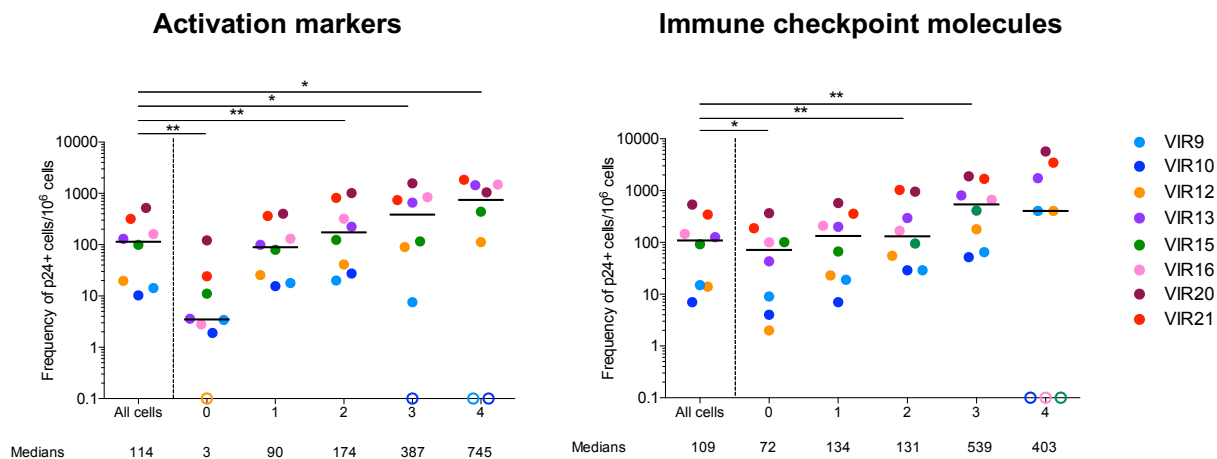


Fig S5. Frequencies of p24+ cells in different subsets. (A) Frequencies of p24+ cells in all cells and in each gated cellular subset in samples from 8 viremic individuals (same as in Fig 4 and 5). (B) Frequencies of p24+ cells in all cells and in each gated cellular subset in samples from 12 virally suppressed individuals (same as in Fig 6). Each sample is represented by a unique color-coded symbol. For statistical analyses, Wilcoxon matched-pairs signed rank test was performed: the median of each column was compared to the median of the first column (all cells). $p^* < 0.05$, $p^{**} < 0.01$, $p^{***} < 0.001$.

A Viremic individuals



B ART-suppressed individuals

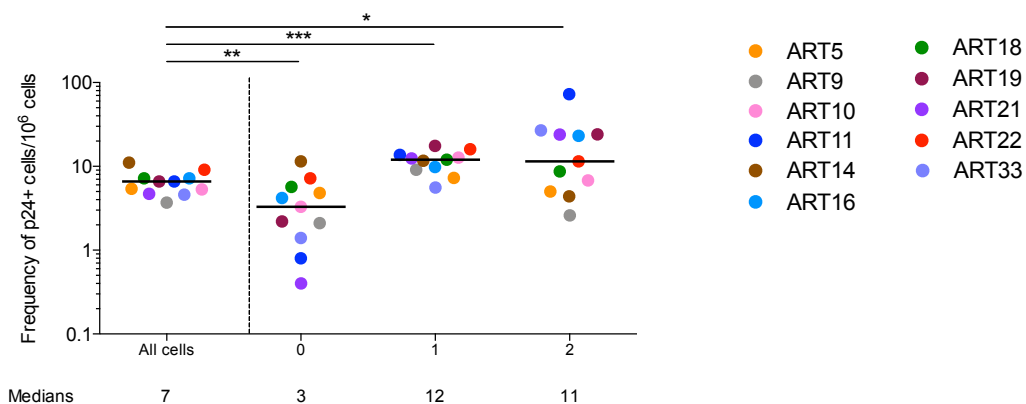
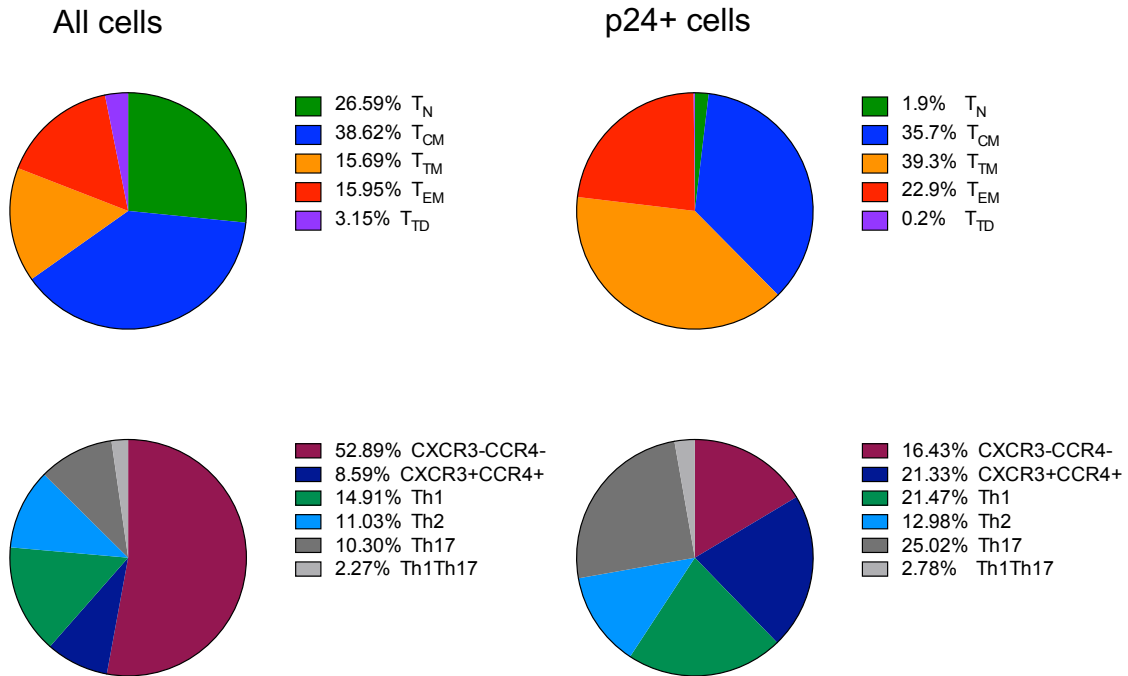


Fig S6. Boolean analysis. (A) Frequencies of p24+ cells in all cells and in cell subsets expressing 0, 1, 2, 3 or 4 markers in samples from 8 viremic individuals (same as in Fig 4 and 5). Analyses were performed on cells expressing CD25/CD95/HLA-DR/Ki-67 (left panel) and PD-1/TIGIT/LAG-3/Tim-3 (right panel). (B) Frequencies of p24+ cells in all cells and in cell subsets expressing 0, 1 or 2 immune checkpoint molecules (PD-1/TIGIT) in samples from 11 virally suppressed individuals (same as in Fig 6). Each sample is represented by a unique color-coded symbol. For statistical analyses, Wilcoxon matched-pairs signed rank test was performed: the median of each column was compared to the median of the first column (all cells). $p^* < 0.05$, $p^{**} < 0.01$, $p^{***} < 0.001$.

A Viremic individuals

Fig S7



B ART-suppressed individuals

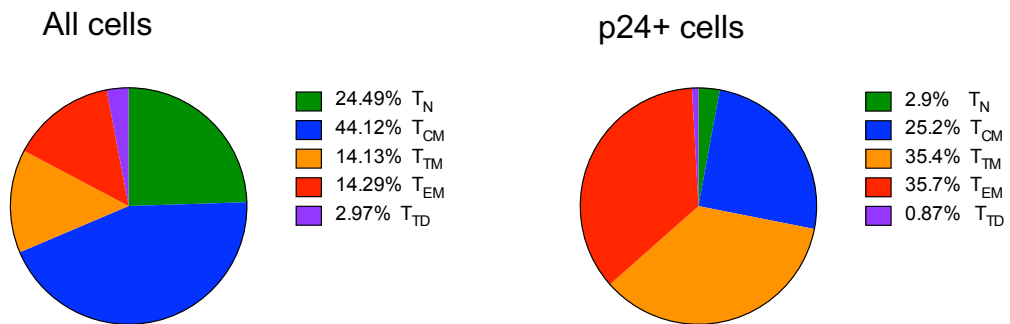


Fig S7. Contribution of different subsets to the pool of p24+ cells. (A) Pie charts comparing the relative contributions of different subsets to the total pool of CD4 T cells (all cells, left) and to the pool of p24+ cells (right) in samples from viremic individuals. Contributions of memory subsets and effector subsets are represented. (B) Pie charts comparing the relative contributions of different subsets to the total pool of CD4 T cells (all cells, left) and to the pool of p24+ cells (right) in samples from ART-suppressed individuals. Contributions of memory subsets are represented.

Fig S8

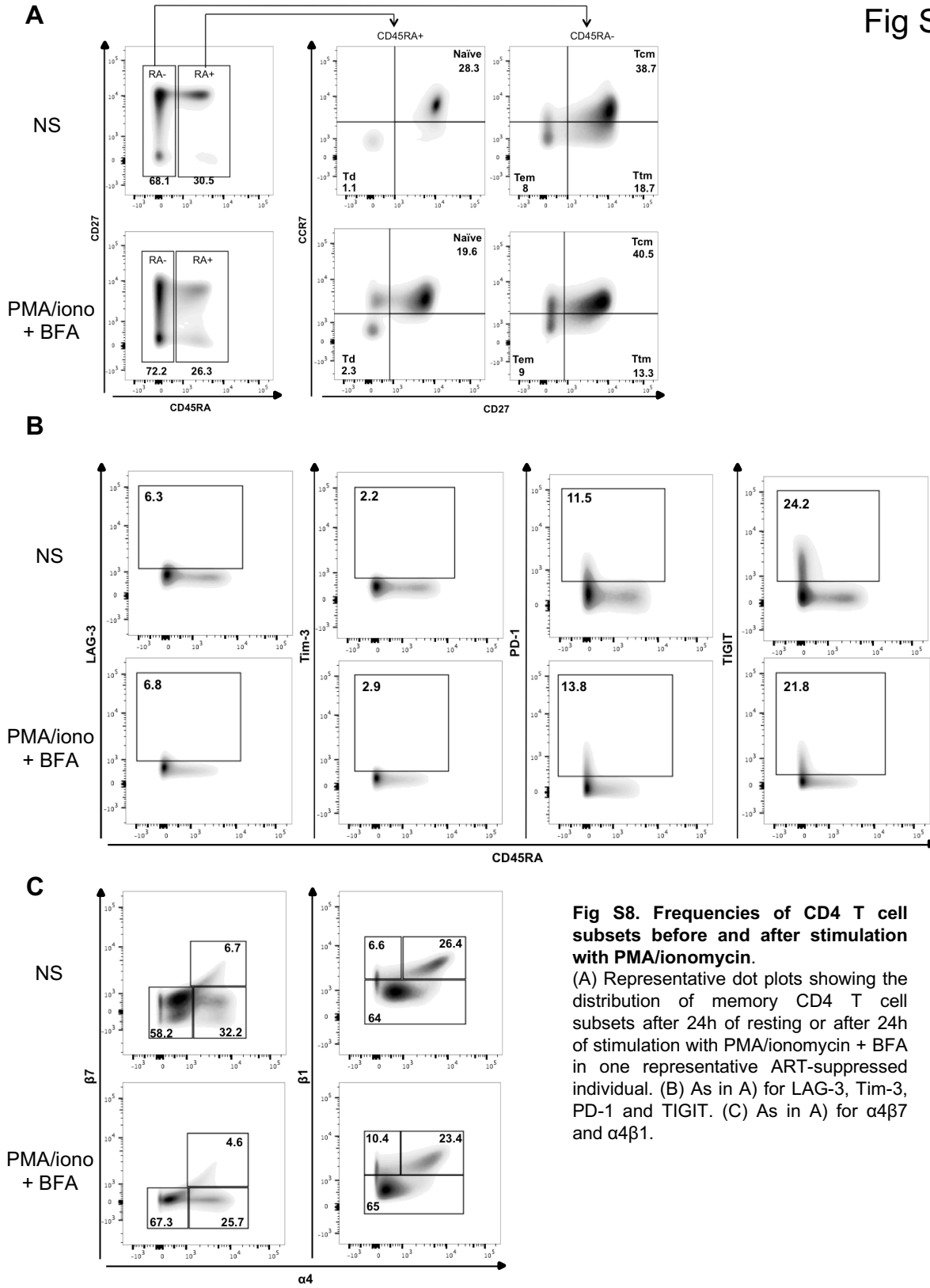


Fig S8. Frequencies of CD4 T cell subsets before and after stimulation with PMA/ionomycin. (A) Representative dot plots showing the distribution of memory CD4 T cell subsets after 24h of resting or after 24h of stimulation with PMA/ionomycin + BFA in one representative ART-suppressed individual. (B) As in A) for LAG-3, Tim-3, PD-1 and TIGIT. (C) As in A) for $\alpha 4\beta 7$ and $\alpha 4\beta 1$.

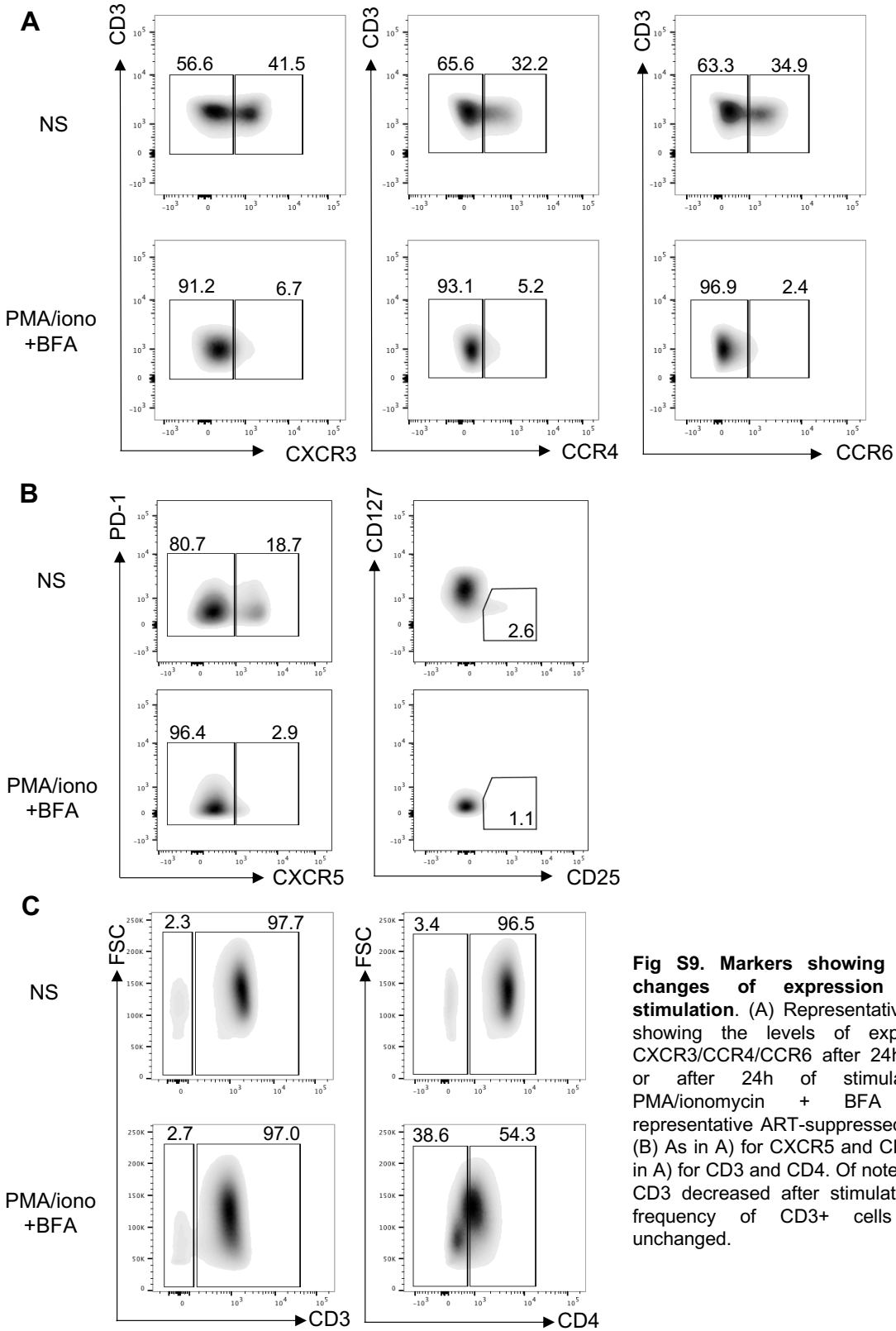


Fig S9

Fig S9. Markers showing significant changes of expression following stimulation. (A) Representative dot plots showing the levels of expression of CXCR3/CCR4/CCR6 after 24h of resting or after 24h of stimulation with PMA/ionomycin + BFA in one representative ART-suppressed individual. (B) As in A) for CXCR5 and CD25. (C) As in A) for CD3 and CD4. Of note, the MFI of CD3 decreased after stimulation but the frequency of CD3+ cells remained unchanged.

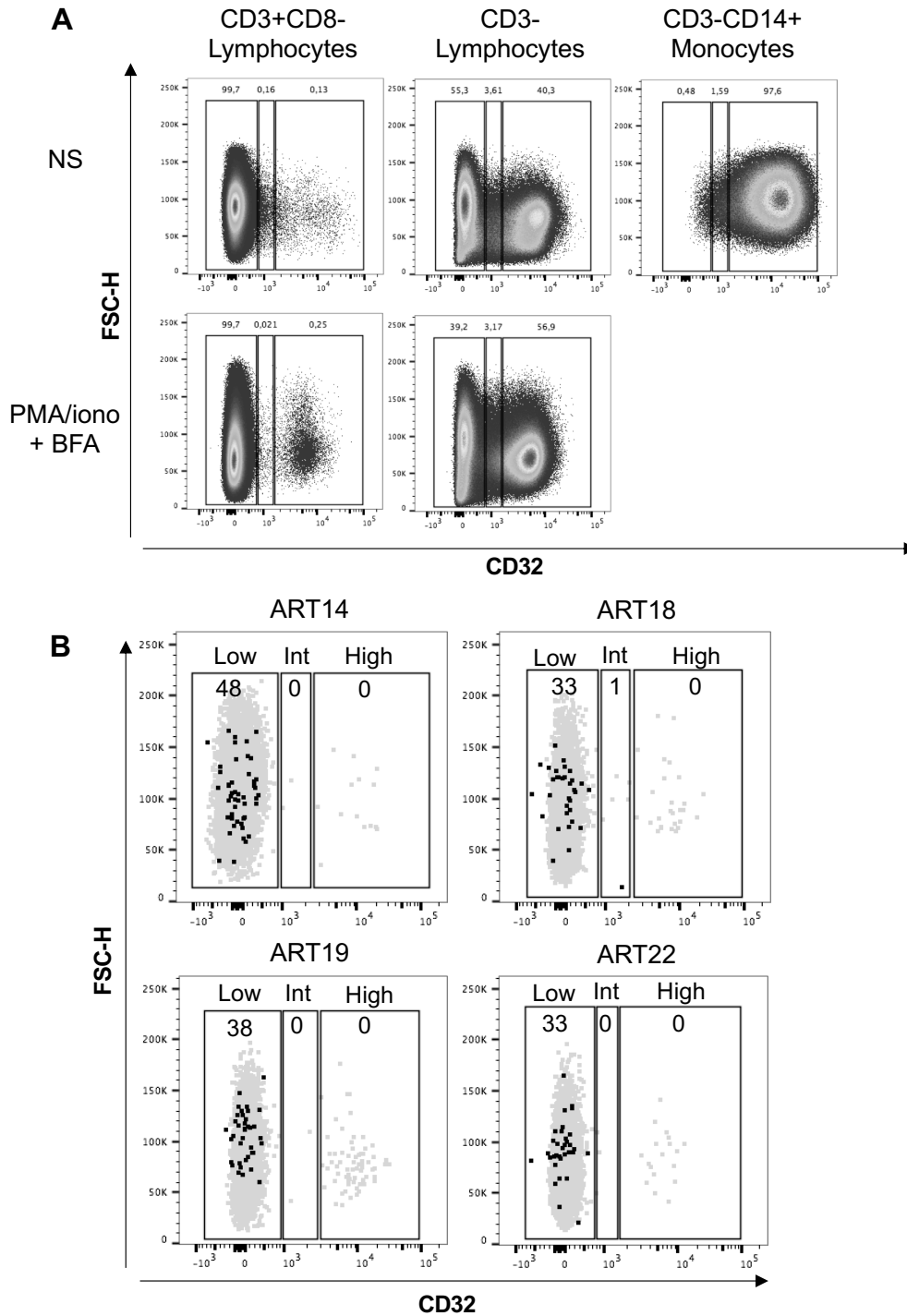


Fig S10. p24+ cells from ART-suppressed individuals are not enriched in cells expressing high levels of CD32. Cryopreserved PBMCs from 4 ART-suppressed individuals were stimulated with PMA/ionomycin + BFA for 24h. (A) Representative dot plots of the CD32 staining in gated CD3+CD8- lymphocytes, CD3- lymphocytes and CD3-CD14+ monocytes, in the absence of stimulation (NS) and after PMA/ionomycin stimulation. (B) Dot plots showing CD32 expression in p24+ events (black) and in all cells (grey).

Fig S11

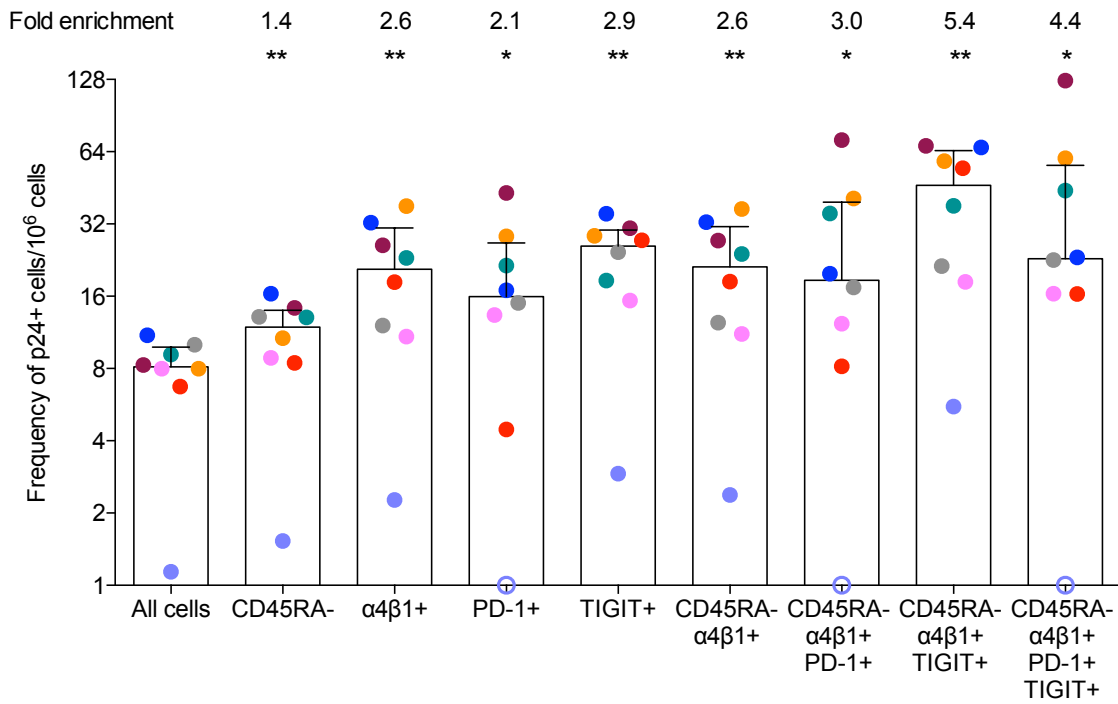


Fig S11. p24-producing cells from ART-suppressed individuals are highly enriched in CD45RA- $\alpha 4\beta 1+$ TIGIT+ cells. Frequencies of p24+ cells in all cells and in each gated cellular subset in samples from 8 ART-suppressed individuals. Each sample is represented by a unique color-coded symbol. Undetectable measurements are represented as open symbols. Mean folds-enrichment compared to all cells are indicated at the top of each bar. For statistical analyses, Wilcoxon matched-pairs signed rank test was performed: median values of each column were compared to the median of the first column (all cells). $p^* < 0.05$, $p^{**} < 0.01$.

Fig S12

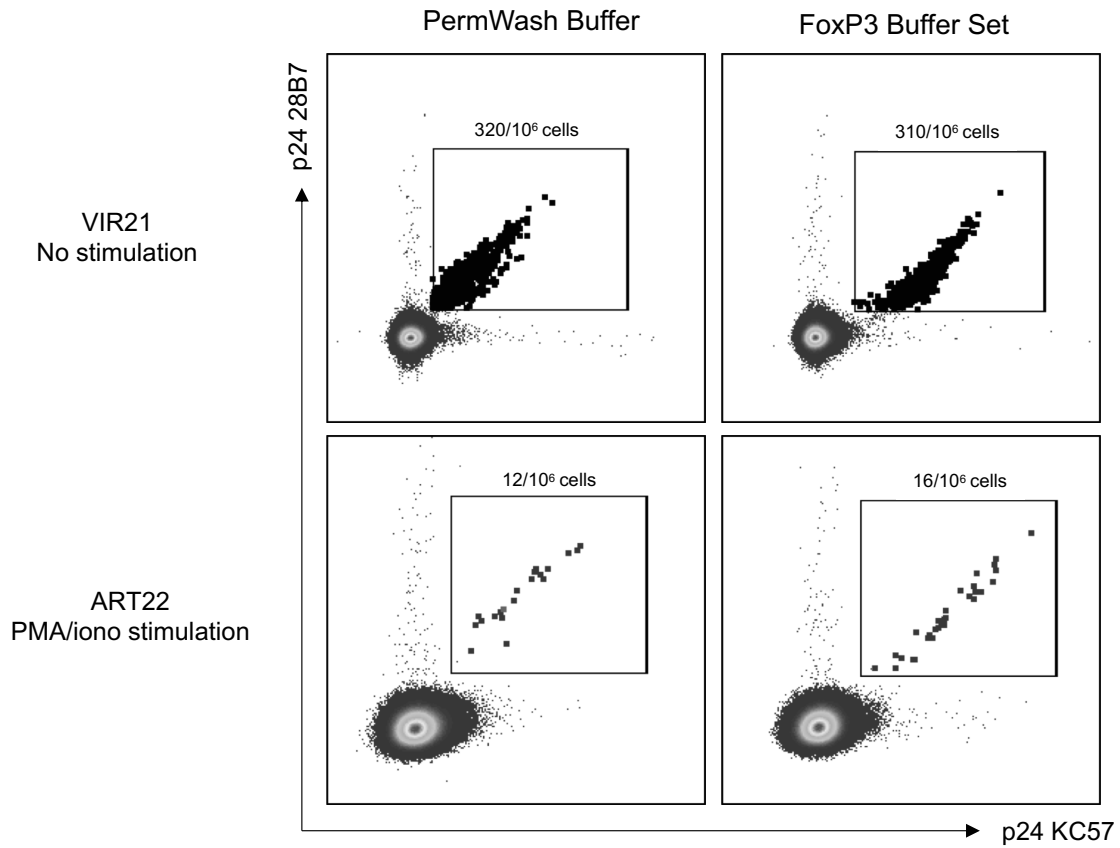


Fig S12. Comparison of two permeabilization buffers for the detection of p24-producing cells by HIV-Flow. Dot plots showing the detection of p24+ cells in 2 samples, using 2 experimental conditions. Purified CD4 T cells from a viremic individual were rested for 18 hours, while purified CD4 T cells from an ART-suppressed individual were stimulated with PMA/ionomycin for 24h. The permeabilization step was performed either with the PermWash Buffer (BD) or with the FoxP3/Transcription Factor Staining Buffer Set (eBioscience).

Fig S13

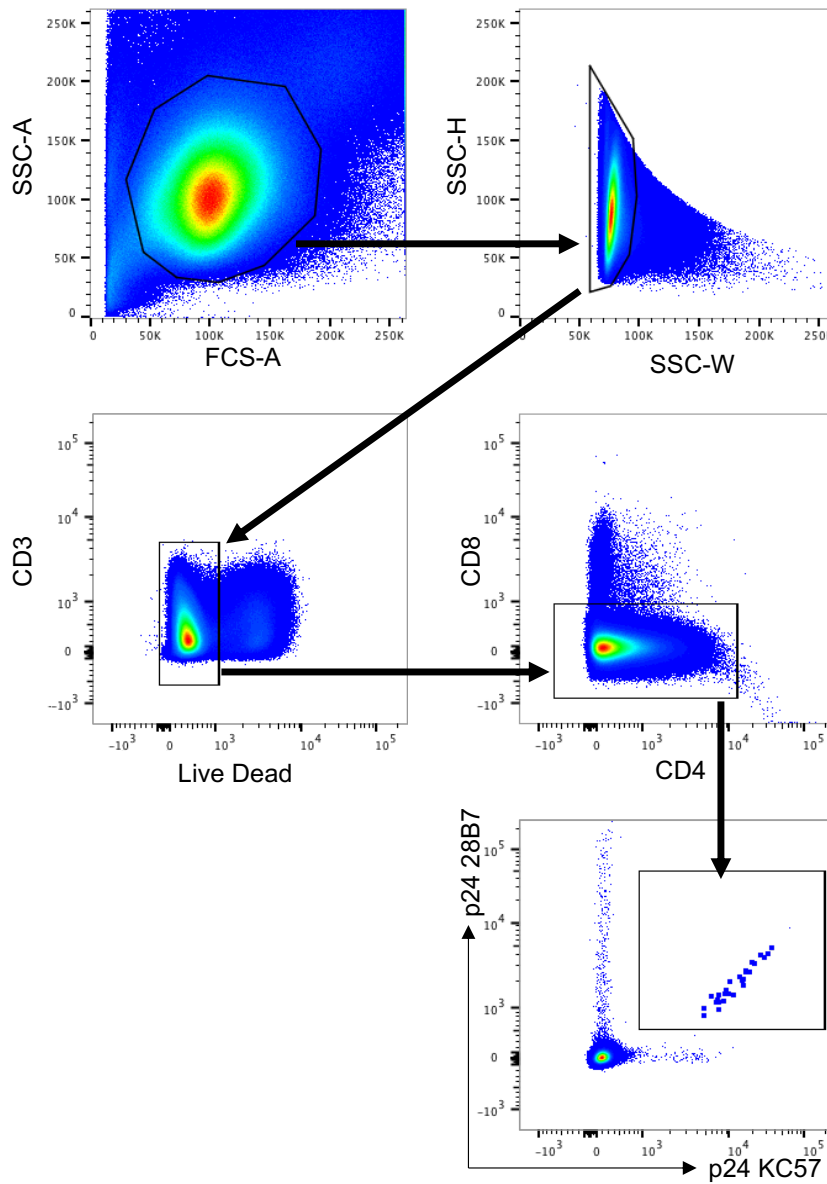


Fig S13. Gating strategy used in HIV-Flow. Example of the gating strategy used for a representative sample following PMA/ionomycin stimulation of CD4+ T cells obtained from an ART-suppressed individual.

Table S1

Table S1: Frequencies of infected cells measured by different assays in samples from ART-suppressed individuals

ID	Total HIV DNA (HIV copies/10 ⁶ CD4 T cells)	Integrated HIV DNA (HIV copies/10 ⁶ CD4 T cells)	TILDA (msRNA+ cells/10 ⁶ CD4 T cells)	HIV-Flow (p24+ cells/10 ⁶ cells)	mQVOA (infectious units/10 ⁶ cells)
ART1	173	125	12.6	0.5	0.8
ART2	971	504	28.8	4.0	0.9
ART3	1025	538	77.0	6.8	1.1
ART4	1335	1388	22.2	<1.0	19.6
ART5	2397	1335	55.3	8.5	1.4
ART6	1438	515	<1.4	4.7	1.3
ART7	377	171	18.0	2.8	3.2
ART8	1464	518	11.4	1.6	0.3
ART9	511	101	13.2	6.5	0.1
ART10	1003	318	33.6	5.8	1.4
ART11	1095	432	23.4	7.8	2.0
ART12	54	14	4.0	<1.3	0.4
ART13	2598	1445	229.6	6.8	3.1
ART14	1381	724	156.2	20.4	1.4
ART15	1294	547	14.6	2.1	0.8
ART16	1035	895	33.2	9.0	0.3
ART17	512	322	6.6	<0.3	0.4
ART18	537	829	90.0	12.0	0.9
ART19	1416	1058	88.6	12.1	46.9
ART20	244	167	29.2	0.2	<0.08
ART21	98	43	5.6	3.9	0.3
ART22	2386	1607	12.7	11.9	2.0
ART23	89	95	2.8	0.7	<0.08
ART24	108	109	1.5	0.3	0.3
<i>Median</i>	1014	510	20.1	4.3	0.9
<i>IQ range</i>	[344-1390]	[156-846]	[10.2-39.0]	[0.7-8.0]	[0.3-1.6]

Table S2

Table S2: Panels of antibodies used for phenotyping of p24+ cells

<i>Samples from viremic individuals</i>					
	Antibody	Clone	Colour	Company	Catalog number
Panel in Fig. 4A	CD3	UCHT1	A700	BD	557943
	CD4	SK3	BUV496	BD	564651
	CD45RA	HI100	BV786	BD	563870
	CD69	FN50	BUV737	BD	564439
	CD25	M-A251	BV421	BD	562442
	HLA-DR	G46-6	BUV395	BD	564040
	CD38	HIT2	PerCPCy5.5	BD	551400
	Ki67	MOPC-21	FITC	BD	556026
	CD95	DX2	Pe-Cy7	BD	561633
Panel in Fig. 4B	CD3	UCHT1	BUV395	BD	557943
	CD4	SK3	BUV496	BD	564651
	CD45RA	HI100	A700	BD	560673
	PD-1	EH12.1	Pe-Cy7	BD	561272
	LAG-3	Polyclonal	FITC	R&D	FAB2319F
	TIGIT	MBSA43	PerCPEF710	eBioscience	46-9500-41
	Tim-3	F38-2E2	BV421	BioLegend	345008
Panel in Fig. 5A and Fig. 5C	CD3	UCHT1	BUV395	BD	557943
	CD4	SK3	BUV496	BD	564651
	CD45RA	HI100	BV786	BD	563870
	CCR7	3D12	BB700	BD	566437
	CD27	O353	BV421	BioLegend	302823
	CXCR5	RF8B2	BB515	BD	564624
	PD-1	EH12.1	BUV737	BD	565299
	CD127	HIL-7R-M21	BV605	BD	562662
	CD25	M-A251	A700	BD	561398
Panel in Fig. 5B and Fig. 5D	CD3	UCHT1	A700	BD	557943
	CD4	SK3	BUV496	BD	564651
	CXCR3	1C6/CXCR3	PerCP-Cy5.5	BD	560832
	CCR4	1G1	BV421	BD	562579
	CCR6	11A9	BUV737	BD	564377
	Alpha4	9F10	Pe-Cy7	BioLegend	304313
	Beta1	MAR4	BB515	BD	564565
	Beta7	FIB504	BUV395	BD	744014
<i>Samples from ART-suppressed individuals</i>					
	Antibody	Clone	Colour	Company	Catalog number
Panel in Fig. 6A	CD3	UCHT1	BUV395	BD	557943
	CD4	SK3	BUV496	BD	564651
	CD45RA	HI100	BV786	BD	563870
	PD-1	EH12.1	BUV737	BD	565299
	LAG-3	Polyclonal	FITC	R&D	FAB2319F
	TIGIT	MBSA43	PerCP-eF710	eBioscience	46-9500-41
	Tim-3	F38-2E2	BV421	BioLegend	345008
Panel in Fig. 6B	CD3	UCHT1	BUV395	BD	557943
	CD4	SK3	BUV496	BD	564651
	CD45RA	HI100	BV786	BD	563870
	CCR7	3D12	BB700	BD	566437
	CD27	O353	BV421	BioLegend	302823
Panel in Fig. 6C	CD3	UCHT1	A700	BD	557943
	CD4	SK3	BUV496	BD	564651
	Alpha4	9F10	Pe-Cy7	BioLegend	304313
	Beta1	MAR4	BB515	BD	564565
	Beta7	FIB504	BUV395	BD	744014

Table S3

Table S3: Median fold differences in the frequencies of p24+ cells and all cells expressing a given cellular marker.

Viremic individuals

	CD69+	1.19
	CD25+	1.55
Fig. 4A	HLA-DR+	2.21
	Ki67+	3.45
	CD38+	1.15
	CD95+	1.72
	LAG-3+	2.02
Fig. 4B	Tim-3+	3.28
	PD-1+	2.49
	TIGIT+	1.59
	CD45RA-	1.48
	TN	0.04
Fig. 5A	TCM	0.85
	TTM	2.60
	TEM	1.38
	TTD	0.00
	CXCR3-CCR4-	0.30
	CXCR3+CCR4+	2.53
Fig. 5B	Th1	1.15
	Th1Th17	1.50
	Th2	1.17
	Th17	2.54
Fig. 5C	pTfh	2.53
	Treg	3.13
Fig. 5D	$\alpha 4\beta 7$	2.07
	$\alpha 4\beta 1$	2.01

ART-suppressed individuals

	LAG-3+	1.30
Fig. 6A	Tim-3+	1.27
	PD-1+	1.65
	TIGIT+	2.23
	CD45RA-	1.31
	TN	0.00
Fig. 6B	TCM	0.67
	TTM	2.63
	TEM	2.55
	TTD	0.00
Fig. 6C	$\alpha 4\beta 7$	0.78
	$\alpha 4\beta 1$	2.21

Chapitre 3 : Les agents anti-latence induisent des réponses différentes dans des réservoirs cellulaires distincts

Contexte et hypothèse : Le VIH persiste sous forme latente dans plusieurs sous-populations de lymphocytes T CD4+ mémoires [mémoires centraux (T_{CM}), mémoires transitionnels (T_{TM}) et mémoires effecteurs (T_{EM})] chez les individus sous ART. Ces 3 sous-populations présentent des propriétés variées en termes de capacité de prolifération et de migration en réponse aux antigènes, de profil cytokinique et épigénétique. En raison de cette diversité, nous avons émis l'hypothèse que les mécanismes soutenant la latence virale sont distincts entre ces différentes sous-populations de lymphocytes T CD4+ mémoires et qu'une combinaison d'agents anti-latence sera nécessaire pour réactiver efficacement le VIH de sa latence dans tous les réservoirs cellulaires simultanément.

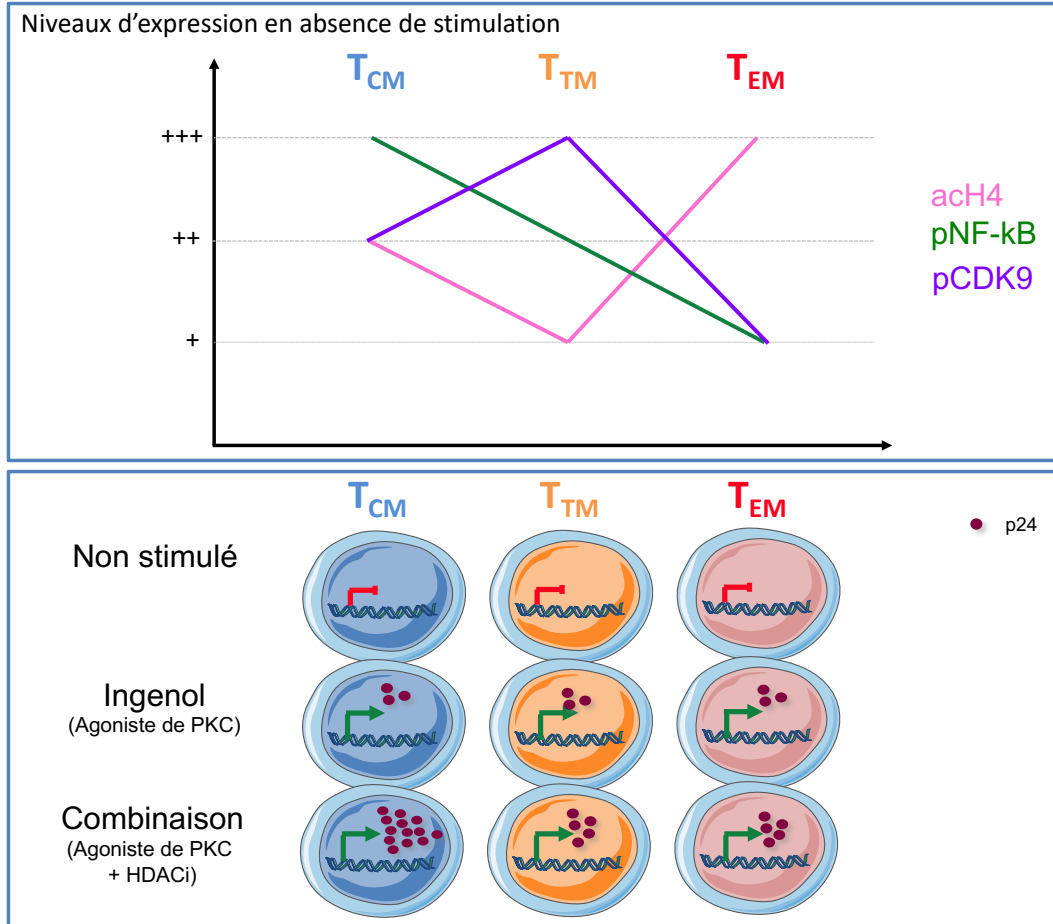
Objectifs : Cette étude comporte trois objectifs principaux :

- Étudier les mécanismes moléculaires soutenant la latence virale dans les différentes sous-populations de lymphocytes T CD4+ mémoires, en mesurant l'expression de divers facteurs cellulaires impliqués dans l'expression virale dans des cultures cellulaires *ex vivo* provenant d'individus sous ART.
- Étudier l'impact des agents anti-latence sur la modulation des facteurs cellulaires impliqués dans l'expression virale au sein des sous population de cellules T CD4+.
- Étudier la capacité des agents anti-latence seuls ou en combinaison à réactiver le virus de sa latence dans les différentes sous-populations de lymphocytes T CD4+ mémoires via l'utilisation du HIV-Flow.

Statut de l'article : Cet article a été soumis pour publication en juin 2019 dans la revue Cell Reports.

Contribution détaillée de chacun des auteurs : Ma contribution personnelle à cet article est de 80%. J'ai développé et réalisé toutes les expériences présentées dans cet article, ainsi que les analyses de données et la présentation des figures. Rémi Fromentin a contribué au développement des expériences. Amélie Pagliuzza a apporté une aide ponctuelle au cours des diverses manipulations. Jean-Pierre Routy a supervisé le recrutement des participants. Nicolas Chomont a supervisé chaque étape de cette étude et a édité le manuscrit avec la contribution de chacun des co-auteurs.

Résumé graphique



Points importants à retenir :

- Plusieurs facteurs impliqués dans l'expression virale (histones acétylées, pNF-kB, pCDK9) sont exprimés à différents niveaux dans les 3 sous-populations de lymphocytes T CD4 mémoires.
- Les agents anti-latence induisent des réponses pharmacologiques distinctes au sein de ces 3 sous-populations.
- La combinaison d'un agoniste de PKC avec un inhibiteur de HDAC permet de réactiver très efficacement la production virale dans les cellules T_{CM} (niveaux de réactivation similaires à ceux induits par la PMA/ionomycine).

Latency Reversing Agents Induce Differential Responses in Distinct Memory CD4 T Cell Subsets in Individuals on Antiretroviral Therapy

Marion Pardons^{1,2}, Rémi Fromentin¹, Amélie Pagliuzza¹, Jean-Pierre Routy³, Nicolas Chomont^{1,2*}

¹ Centre de Recherche du CHUM, Montreal, Canada

² Department of Microbiology, Infectiology and Immunology, Université de Montréal, Montreal, Canada

³ Division of Hematology & Chronic Viral Illness Service, McGill University, Montreal, Canada

* Corresponding author :

Nicolas Chomont

Université de Montréal, Centre de Recherche du CHUM, 900 rue St-Denis, H2X0A9, QC, Canada

Tel : +1 514-890-8000 #31266

E-mail : nicolas.chomont@umontreal.ca

Keywords: HIV reservoir, latency, reversal, LRA, memory subsets, HIV-Flow

Summary

Latent proviruses persist in central (T_{CM}), transitional (T_{TM}) and effector (T_{EM}) memory cells. We measured the levels of cellular factors involved in HIV gene expression in these subsets. Highest levels of acetylated H4, active NF- κ B, and active P-TEFb were measured in T_{EM} , T_{CM} and T_{TM} cells, respectively. Vorinostat and romidepsin displayed opposite abilities to induce H4 acetylation across subsets. PKC agonists were more efficient at inducing NF- κ B phosphorylation in T_{CM} cells but were more potent at activating PTEF-b in the T_{EM} subset. We selected the most efficient LRAs and measured their ability to reverse latency in each subset. While ingenol alone had modest activities in the three subsets, its combination with an HDACi dramatically increased latency reversal in T_{CM} cells. Altogether, these results indicate that cellular HIV reservoirs are differentially responsive to common LRAs and suggest that combination of compounds will be required to achieve latency reversal in all subsets.

Introduction

More than 30 years after its discovery, there is still no cure for HIV infection and more than 35 million people live with the virus worldwide. Although antiretroviral therapy (ART) drastically reduces plasma viremia and improves the quality of life of people living with HIV (Palella et al., 1998), it does not eradicate the virus from the body (Palmer et al., 2008), and causes rebound after ART cessation in all but exceptional cases (Saez-Cirion et al., 2013). HIV persists in cellular reservoirs, which are not sensitive to ART, invisible to the host immune system, and in which the virus can persist through latency and possibly residual replication (Chun et al., 1997; Finzi et al., 1997; Wong et al., 1997). In virally suppressed individuals, integrated HIV genomes primarily persist in memory CD4 T cells (Chun et al., 1998a; Finzi et al., 1999; Siliciano et al., 2003) and particularly in subsets of memory CD4 T cells including central (T_{CM}), transitional (T_{TM}) and effector (T_{EM}) memory CD4 T cells, whereas naïve cells (T_N) minimally contribute to the pool of infected cells (Buzon et al., 2014; Chomont et al., 2009; Jaafoura et al., 2014).

Several therapeutic strategies have been proposed to reduce or eradicate HIV cellular reservoirs (Cillo and Mellors, 2016; Deeks et al., 2016). Inducing latency reversal in latently infected cells is one of the suggested approaches to achieve a functional cure for HIV infection (Chun et al., 1998b; Lehrman et al., 2005; Ylisastigui et al., 2004). This strategy consists in forcing viral gene expression by using latency reversing agents (LRAs) while maintaining ART to avoid new rounds of viral replication. Latently infected cells in which HIV expression is induced would be subsequently cleared by the host immune system and/or through viral cytopathic effects. A variety of LRAs have been tested for their ability to reactivate HIV expression *in vitro*, *ex vivo* and *in vivo* (Archin et al., 2009; Bartholomeeusen et al., 2013; Bartholomeeusen et al., 2012; Budhiraja and Rice, 2013; Bullen et al., 2014; Fujinaga et al., 2015; Jiang et al., 2015; Spina et al., 2013; Tsai et al., 2016; Wei et al., 2014; Williams et al., 2004). Even though these LRAs induced increases in cell-associated HIV RNA or in plasma viremia *in vivo*, none of these clinical interventions led to a significant reduction in the size of the HIV reservoir (Archin et al., 2010; Archin et al., 2008; Archin et al., 2017; Archin et al., 2012; Delagreverie et al., 2016; Elliott et al., 2014; Gutierrez et al., 2016; Rasmussen et al., 2014; Routy et al., 2012; Sagot-Lerolle et al., 2008; Siliciano et al., 2007; Sogaard et al., 2015). This suggests that LRAs alone might not be potent enough to induce viral epitopes exposure and subsequent killing of latently infected cells. In this context, several studies have shown that combinations of LRAs were more potent at inducing viral expression than LRAs alone *in vitro* and *ex vivo* (Darcis et al., 2015; Jiang et al., 2015; Laird et al., 2015; Martinez-Bonet et al., 2015; Spivak and Planelles, 2018). While some combinations have been evaluated in clinical trials for cancer therapy (Suraweera et al., 2018), none of these combinatorial interventions have been tested to reactivate latent HIV *in vivo* yet. Studies assessing the impact of LRAs combinations on viral reactivation *ex vivo* should facilitate the implementation of combinatorial interventions in clinical trials.

Proviral latency is a multifactorial phenomenon that involves epigenetic factors such as histone deacetylation (Coull et al., 2000; Imai and Okamoto, 2006 ; Jiang et al., 2007; Marban et al., 2007; Tyagi and Karn, 2007; Williams et al., 2006) and DNA methylation (Blazkova et al., 2009; Kauder et al., 2009; Trejbalova et al., 2016) as well as non-epigenetic mechanisms such as the cytoplasmic sequestration of inducible host transcription factors involved in viral transcription (e.g. NF- κ B and NFAT) (Baeuerle and Baltimore, 1988; Rao et al., 1997), low levels of the positive transcription elongation factor b (P-TEFb) and its sequestration in a large inactive complex (Chiang et al., 2012; Nguyen et al., 2001; Ramakrishnan et al., 2009; Tyagi et al., 2010), and the presence of micro-RNAs responsible for HIV silencing (Rice, 2015). Of note, the majority of these mechanisms regulating HIV gene expression and latency were originally characterized in cell lines, which are unlikely to recapitulate the complexity of HIV latency *in vivo*. Although several blocks to HIV transcription have been confirmed in CD4 T cells from virally suppressed individuals (Yukl et al., 2018), whether proviral latency results from similar mechanisms in phenotypically and functionally distinct cellular reservoirs remains largely unknown.

Given that the three subsets of memory CD4 T cells that harbour the majority of integrated genomes have different proliferative capacity, homing potential and activation status (Barski et al., 2017; Durek et al., 2016; Masopust et al., 2001; Okada et al., 2008; Reinhardt et al., 2001; Riou et al., 2007; Sallusto et al., 1999), we hypothesized that latency could result from different mechanisms in these three reservoirs. In this study, we developed flow cytometry-based assays to measure the expression of cellular factors involved in HIV latency in subsets of CD4 T cells (T_N , T_{CM} , T_{TM} , T_{EM}) from ART-suppressed individuals, including levels of histone acetylation (H3K9, H4K5/8/12/16), active NF- κ B (phospho-serine529), and active P-TEFb (phospho-serine175 CDK9). We also measured the relative expression of various miRNA involved in the inhibition of HIV replication in the different subsets. In addition, we measured the capacity of LRAs [histone deacetylases inhibitors: vorinostat, panobinostat, romidepsin; PKC agonists: bryostatin, ingenol, prostratin; and P-TEFb inducers: JQ-1] at modulating these factors. Finally, we assessed the ability of LRAs alone or in combinations at inducing viral reactivation in the different subsets of memory CD4 T cells by using a novel p24 flow cytometry-based assay.

Results

HDAC inhibitors display variable activities in subsets of memory CD4 T cells

It is well established that histone deacetylation contributes to HIV latency in primary CD4 T cells (Coull et al., 2000; Imai and Okamoto, 2006 ; Jiang et al., 2007; Marban et al., 2007; Tyagi and Karn, 2007; Williams et al., 2006). However, whether this mechanism represses HIV expression to similar levels in different subsets of CD4 T cells harbouring latent proviruses is not known. We developed a flow cytometry-based assay to measure the levels of H3K9 and H4K5/8/12/16 in subsets of CD4 T cells and evaluated the pharmacological activity of three HDACi (vorinostat, panobinostat and romidepsin) in these cellular reservoirs (T_{CM} , T_{TM} and T_{EM} cells).

PBMCs from ART-suppressed individuals were exposed to increasing doses of HDACi and the levels of acetylation of histones H3 and H4 were assessed by flow cytometry (Figure 1, Figure S1). Based on the dose-response curves obtained in total CD4 T cells (Figure 1A, B), we observed that panobinostat and romidepsin displayed lower EC50s than vorinostat (4nM, 9nM and 510nM, respectively), indicating that panobinostat and romidepsin were more potent at inducing histone H4 acetylation in total CD4 T cells than vorinostat (Figure 1C). Maximal fold inductions in the levels of acetylated H4 (top plateau values) were relatively similar for the three HDACi (2.5, 2.8 and 2.5 fold for vorinostat, panobinostat, and romidepsin, respectively, Figure 1D), demonstrating similar efficacies for the three HDACi in total CD4 T cells. Similar results were observed with acetylated histone H3 (Figure S1).

In the absence of LRA, baseline levels of acetylated histone H4 were significantly higher in T_{EM} cells compared to the other subsets (median MFIs: $T_{EM} = 4583 > T_{CM} = 4032 > T_{TM} = 3756$, Figure 1E, F), suggesting that the chromatin was less tightly compacted in T_{EM} cells.

We assessed the relative capacity of the three HDACi at inducing histone H4 acetylation in different subsets of CD4 T cells. Exposure to HDACi resulted in a dose-dependent increase in H4 acetylation in all subsets (Figure 1G). EC50 analyses revealed that vorinostat was more potent at inducing H4 acetylation in T_{CM} than in T_{EM} (median EC50s: 465nM and 929nM, respectively), whereas romidepsin displayed an opposite profile (median EC50s: 11.3nM and 8.1nM in T_{CM} and T_{EM} , respectively), revealing a broad diversity of activities between subsets among LRAs from the same class (Figure 1H). No significant differences in EC50 were observed between subsets when using panobinostat, suggesting that this HDACi had similar activity in the three subsets (Figure 1H). For all three HDACi tested, fold inductions at the top plateau tended to be higher in T_{CM} and T_{EM} cells compared to T_{TM} cells (Figure 1I). Comparable results were obtained when measuring acetylation of histone H3 (Figure S1).

We next sought to determine if the observed differences between CD4 T cell subsets could be attributed to various levels of HDACi uptake across subsets. We exposed sorted cells from each subset to vorinostat (500 nM), panobinostat (5 nM) or romidepsin (10 nM) and measured the intracellular concentration of each HDACi by LC-MS/MS analysis. For the three HDACi tested, the

intracellular concentration of the drug did not significantly differ between the different CD4 T cell subsets (Figure S2), excluding the possibility that the differential pharmacological activities of HDACi could be attributed to various levels of drug penetration between the different subsets.

Altogether, these data indicate that the non-selective pan-HDACi vorinostat and the selective class I HDACi romidepsin display opposite activities in different subsets of CD4 T cells. Panobinostat displayed low and similar EC50 across the three memory subsets. Although similar across subsets, maximal fold inductions in H4 acetylation were consistently higher in T_{EM} cells.

PKC agonists display variable activities in subsets of memory CD4 T cells

Sequestration of NF- κ B in the cytoplasm is known to play a key role in the maintenance of HIV latency (Baeuerle and Baltimore, 1988; Colin and Van Lint, 2009). Activation of the PKC pathway results in NF- κ B phosphorylation, which causes its translocation to the nucleus and promotes viral reactivation. We measured the ability of four PKC agonists (PMA, bryostatin-1, ingenol-3-angelate and prostratin) at inducing NF- κ B activation.

PBMCs from ART-suppressed individuals were exposed to increasing doses of PKC agonists and levels of phospho-NF- κ B (pS529) were assessed by flow cytometry. The four PKC agonists induced a dose-dependent increase of NF- κ B phosphorylation in total CD4 T cells (Figure 2A, B). As expected, PMA was the most potent at inducing NF- κ B phosphorylation (median EC50s: PMA=14nM > ingenol=36nM > bryostatin=45nM > prostratin=2034nM, Figure 2C). In addition, exposure to bryostatin resulted in a lower maximal fold induction in NF- κ B phosphorylation compared to the other PKC agonists, while PMA exhibited the highest efficiency (medians: bryostatin=4.2 < ingenol=5.4 < prostratin=5.6 < PMA=6.7, Figure 2D).

In the absence of stimulation, baseline levels of pNF- κ B were significantly higher in T_{CM} cells compared to T_{TM} and T_{EM} cells (median MFIs: 1387, 1233 and 1155, respectively, Figure 2E, F).

We next measured the relative ability of these four PKC agonists at inducing NF- κ B phosphorylation in the different subsets of CD4 T cells. Stimulation of CD4 T cells with PKC agonists resulted in a dose-dependent increase of NF- κ B phosphorylation in all memory subsets (Figure 2G). Determination of EC50 revealed that PMA and prostratin were more potent at inducing NF- κ B phosphorylation in T_{CM} than in T_{EM} cells (median EC50s for PMA: 12.1nM and 16.9nM, respectively; for prostratin: 1.9 μ M and 2.3 μ M, respectively). Bryostatin and ingenol displayed similar EC50s across the three memory subsets (Figure 2H). Interestingly, fold inductions at the top plateau were consistently higher in T_{CM} cells compared to T_{EM} cells for the four PKC agonists tested ($p < 0.05$, T_{CM} > T_{TM} > T_{EM}) (Figure 2I).

Taken together, these results demonstrate that PMA and prostratin have a higher potency in T_{CM} cells compared to T_{EM} cells whereas bryostatin and ingenol display similar potencies across

subsets. All the PKC agonists we tested displayed a higher efficacy in T_{CM} cells compared to more differentiated subsets.

PKC agonists are more potent at activating P-TEFb in differentiated subsets

In latently infected CD4 T cells, HIV transcriptional elongation is restricted by low levels of P-TEFb (composed of CDK9 and Cyclin T1) and its sequestration in an inactive complex (Chiang et al., 2012; Hoque et al., 2011; Nguyen et al., 2001; Ramakrishnan et al., 2009; Tyagi et al., 2010).

We exposed PBMCs from ART-suppressed individuals to increasing doses of the P-TEFb inducer JQ-1 and PKC agonists, and measured levels of pS175 CDK9, a surrogate of P-TEFb activation (Mbonye et al., 2013), by flow cytometry. As expected, JQ-1 displayed no measurable activity on CDK9 phosphorylation in these resting CD4 T cells (data not shown), which are largely devoid of P-TEFb (Chiang et al., 2012; Hoque et al., 2011 ; Tyagi et al., 2010). In contrast, the PKC agonists bryostatin and ingenol induced a dose-dependent increase in CDK9 phosphorylation in total CD4 T cells (Figure 3A, B). Exposure to bryostatin resulted in a lower EC50 compared to ingenol (median EC50s: 8.4nM and 19.2nM, respectively, Figure 3C) and a slightly higher fold induction at the top plateau (medians: 2.6 and 2.0, respectively; Figure 3D).

In the absence of stimulation, pCDK9 was expressed at higher levels in T_{TM} cells compared to all other subsets (median MFIs: T_{TM}=1237 > T_{CM}=1088> T_{EM}=842, Figure 3E, F). Stimulation with all PKC agonists resulted in a dose-dependent increase in CDK9 phosphorylation in the three memory subsets (Figure 3G). Bryostatin and ingenol tended to be more potent at inducing CDK9 phosphorylation in the T_{EM} compartment compared to T_{TM} and T_{CM} cells (median EC50s for bryostatin: 2.7nM, 4.3nM, 9.4nM, respectively; for ingenol: 5.1nM, 6.6nM, 20.2nM, respectively)(Figure 3H). For both PKC agonists, fold inductions at the top plateau were consistently lower in T_{TM} cells compared to T_{CM} and T_{EM} cells, (Figure 3I).

Altogether, these results show that baseline levels of pCDK9 are significantly different between memory subsets, with T_{TM} cells displaying the highest levels of pCDK9. This resulted in a lower fold induction at the top plateau in this subset compared to T_{CM} and T_{EM} cells. EC50 analyses revealed that the potency of bryostatin and ingenol is maximal in the most differentiated subsets.

miR125b and miR155 are expressed at different levels in CD4 T cell subsets

Several miRNA have the ability to inhibit HIV replication and might consequently be involved in viral latency (Rice, 2015). We measured the relative expression of several cellular miRNA (125b, 150, 155, 196b, 223, 27b, 28, 29b) by RT-qPCR in CD4 T cell subsets. Two miRNAs were expressed at significantly different levels between subsets. miR125b, which was previously described to bind the 3' end of HIV transcripts and to contribute to HIV latency in resting T cells

(Huang et al., 2007), was expressed at higher levels in the less differentiated T_N and T_{CM} subsets compared to the more differentiated T_{EM} cells ($p < 0.01$ for the comparison $T_N:T_{EM}$). In contrast, miR155, which was shown to reinforce proviral latency (Ruelas et al., 2015), was expressed at higher levels in T_{EM} cells ($p < 0.01$ for the comparison $T_N:T_{EM}$ and $p < 0.05$ for $T_{CM}:T_{EM}$)(Figure 4). Altogether these data indicate that several miRNAs involved in HIV latency are differentially expressed between subsets.

PKC agonists in combination with HDACi have enhanced capacity to reactivate HIV in T_{CM} cells

We previously developed a flow-cytometry based assay to quantify and characterize latently infected cells (Pardons et al., 2019). We took advantage of the HIV-Flow assay to measure the frequency of p24-producing cells in each subset upon reactivation with a panel of LRAs and their combinations. Among the HDACi, we selected the non-selective pan-HDACi panobinostat, and the selective class I HDACi romidepsin which both displayed low EC50 compared to vorinostat (Figure 1C). Among the different PKC agonists, we selected ingenol because of its high potency compared to bryostatins and prostratin (Figure 2C), and because of its relatively similar activity in each memory subset (Figure 2H).

We used relatively high doses of LRAs to achieve maximal efficacy for histone acetylation, PTEF-b induction and NF- κ B activation. Panobinostat and romidepsin (100nM) had limited to no effect on latent HIV (medians of the % of maximal reactivation by PMA and ionomycin: 1.6%, 0.3%, respectively; Figure 5A). In contrast, the PKC agonist ingenol (500nM) induced viral reactivation in samples from all participants (median % of maximal reactivation = 18.5%; Figure 5A). Combinations of ingenol with an HDACi further increased the frequencies of p24+ cells (median % of maximal reactivation: 36% for panobinostat+ingenol and 32.6% romidepsin+ingenol; Figure 5A). Intriguingly and consistent with our aforementioned observations reporting no effect of JQ-1 on PTEF-b activation, the addition of JQ-1 to the combination panobinostat+ingenol did not increase the frequency of p24+ cells (Figure S4A).

To assess the activity of the LRAs and their combinations in different cells subsets, we analysed the memory phenotype of p24-producing cells following reactivation (Figure 5B, C; Figure S3; Figure S4B, C). As expected, p24-producing cells were rarely observed within the T_N cells and T_{TD} subsets which have been shown to minimally contribute to the pool of infected cells during ART (Chomont et al., 2009) (data not shown). Following reactivation with PMA/ionomycin, ingenol, and LRA combinations, the T_{TM} and T_{EM} subsets often encompassed higher frequencies of p24+ cells than T_{CM} cells (Figure 5B). Combinations of LRAs led to higher frequencies of p24-producing cells compared to LRAs alone in all subsets (Figure S4B).

We then expressed the frequencies of p24+ cells from each subset in each condition relative to the frequencies measured following activation with PMA/ionomycin (Figure 5C, Figure S4C).

Although ingenol tended to have a slightly higher capacity to reactivate HIV in T_{CM} cells, no significant differences were observed between subsets (medians = 27.4%, 14.0%, 10.9% for T_{CM}, T_{TM}, T_{EM}, respectively; Figure 5C). Strikingly, the combination of ingenol with an HDACi induced potent HIV reactivation in T_{CM} cells to levels comparable or higher than those measured with PMA/ionomycin (medians = 104.1% and 73.7% for panobinostat+ingenol and romidepsin+ingenol, respectively; Figure 5C, Sup Figure 4C). Interestingly, this synergistic effect was restricted to T_{CM} cells and not observed in the T_{TM} and T_{EM} subsets (Figure 5C, Figure S4C).

Altogether, our results indicate that combinations of LRAs are more potent at reactivating HIV than LRAs alone and demonstrate that this phenomenon is in part attributed to a synergistic effect of these combinations in latently infected T_{CM} cells.

Discussion

The three major cellular compartments in which HIV persists differ in their proliferative capacities, homing potentials and cytokine production profiles (Barski et al., 2017; Durek et al., 2016; Masopust et al., 2001; Okada et al., 2008; Reinhardt et al., 2001; Riou et al., 2007; Sallusto et al., 1999). Given this diversity, we hypothesized that mechanisms driving HIV latency may also differ between these three subsets. We observed that factors involved in HIV latency and reactivation (acetylated histones H3/H4, pNF- κ B, pCDK9, miR125b and miR155) are expressed at significantly different levels between these subsets. In addition, our results show that the majority of commonly used LRAs display different activities in distinct reservoirs.

Multiple studies have shown that histone deacetylation plays an important role in HIV latency. During proviral latency, HDACs are recruited to the HIV promoter by various transcription factors leading to chromatin compaction and transcriptional repression (Coull et al., 2000; Imai and Okamoto, 2006; Jiang et al., 2007; Marban et al., 2007; Tyagi and Karn, 2007; Williams et al., 2006). In this study, we observed that baseline levels of acetylated histones H3/H4 are higher in T_{EM} cells, which is in agreement with their elevated transcriptional activity (Durek et al., 2016). Several HDACi have been shown to reactivate HIV expression *in vitro*, *ex vivo*, and *in vivo* (Archin et al., 2010; Archin et al., 2008; Archin et al., 2009; Archin et al., 2017; Archin et al., 2012; Elliott et al., 2014; Rasmussen et al., 2014; Routy et al., 2012; Sagot-Lerolle et al., 2008; Siliciano et al., 2007; Sogaard et al., 2015; Tsai et al., 2016; Wei et al., 2014). We observed that panobinostat and romidepsin are more potent at inducing histone acetylation than vorinostat, as demonstrated by their relatively low EC50 in CD4 T cells. This is consistent with our pharmacodynamic measures showing a higher percentage of HDACi uptake with panobinostat and romidepsin compared to vorinostat (data not shown). Vorinostat and panobinostat belong to the class of hydroxamic acids and act on class I and II HDACs, whereas romidepsin is a cyclic peptide and is specific to class I HDACs (Xu et al., 2007). Multiple studies have reported different activities between these two classes of HDACi. In fact, vorinostat exhibits little to no inhibition of CD8 cytotoxic functions, while romidepsin has a pronounced inhibitory effect on CTL killing (Jones et al., 2014). Moreover, unlike vorinostat, romidepsin is a substrate for the efflux transporter MDR-1 (multidrug resistance protein 1) (Ni et al., 2015). In our study, we observed that vorinostat is more potent at inducing histone acetylation in T_{CM} cells than in T_{EM} cells whereas romidepsin displays the opposite trend. This observation was not explained by a differential uptake of HDACi between memory subsets. Whether these differential activities may be attributed to differences in the relative proportions of class I/II HDACs between T_{CM} and T_{EM} cells remains to be determined.

Another mechanism involved in HIV latency is the sequestration of the transcription factor NF- κ B in the cytoplasm by its inhibitor I κ B (Baeuerle and Baltimore, 1988). At baseline, we measured higher levels of pNF- κ B in T_{CM} cells than in T_{EM} cells, which is in line with the increased survival

potential of T_{CM} cells compared to T_{EM} cells (Macallan et al., 2004; Riou et al., 2007; Sallusto et al., 2004). In fact, the NF- κ B pathway is known to promote T cell survival by increasing the expression of several genes involved in the inhibition of the apoptotic machinery (Luo et al., 2005). PKC agonists induce HIV expression *in vitro* and *ex vivo* (Bullen et al., 2014; Jiang and Dandekar, 2015; Jiang et al., 2015; Mehla et al., 2010; Spina et al., 2013; Williams et al., 2004). Bryostatin has been tested in a clinical trial but failed to increase cell-associated HIV RNA, probably due to low plasma concentrations (Gutierrez et al., 2016). By measuring EC₅₀ of several PKC agonists, we found that ingenol and bryostatin are more potent at activating NF- κ B than prostratin, which is consistent with the fact that prostratin has the lowest capacity to bind PKC, whereas bryostatin displays a high binding activity to PKC (Bogi et al., 1998). By analysing the effect of each PKC agonist in distinct memory subsets, we observed that PMA and prostratin are more potent at inducing NF- κ B phosphorylation in T_{CM} than in T_{EM} cells, while no significant differences in EC₅₀ were observed between subsets for bryostatin and ingenol. These differences between PKC agonists might be explained by a differential selectivity towards PKCs. Indeed, PMA and prostratin are phorbol esters that bind to the diacylglycerol binding domain of conventional (PKC α , PKC β , and PKC γ) and novel PKCs (PKC δ , PKC ϵ , PKC η , and PKC θ) leading to their activation (Beans et al., 2013). In contrast, bryostatin is a selective activator of the conventional PKC α and the novel PKC δ (Mehla et al., 2010), and ingenol-3-Angelate activates PKC δ while inhibiting PKC α (Benhadji et al., 2008). Interestingly, other studies have reported opposite effects of bryostatin and prostratin on various CD8 and NK cell functions (Clutton and Jones, 2018; Desimio et al., 2018). Future studies will be needed to measure the relative proportions of the different PKC in memory CD4 T cell subsets, which may underlie our observations. In spite of these differences in potency, all PKC agonists displayed a higher efficacy (fold induction at the top plateau) in the T_{CM} compared to the T_{EM} subset, which is consistent with the elevated proliferation potential of long-lived T_{CM} cells compared to other memory subsets (Sallusto et al., 2004; Sallusto et al., 1999).

Another non-epigenetic mechanism contributing to HIV latency is the restricted levels of the elongation factor P-TEFb (composed of CDK9 and Cyclin T1) in resting memory cells (Tyagi et al., 2010) due to high levels of miRNAs targeting Cyclin T1 (Chiang et al., 2012; Hoque et al., 2011) and to the sequestration of P-TEFb in a large inactive complex (Nguyen et al., 2001). Consequently, activation of the P-TEFb pathway first requires to increase the quantity of Cyclin T1 and then to dissociate P-TEFb from its inactive complex (Bartholomeeusen et al., 2013), which leads to the phosphorylation of CDK9 on Ser175 (Mbonye et al., 2013). Bromodomains inhibitors such as JQ-1 are known to act by releasing P-TEFb from its inactive complex and by limiting the interaction between P-TEFb and the bromodomain BRD4, which favours the binding of the HIV Tat protein to the active P-TEFb (Bartholomeeusen et al., 2012). In our study, P-TEFb inducers had no measurable impact on the levels of activated P-TEFb, which may be explained by the low

levels of P-TEFb in resting CD4 T cells (Chiang et al., 2012; Hoque et al., 2011). However, the PKC agonists bryostatin and ingenol rapidly induced the phosphorylation of CDK9, which is in line with previous studies showing that PKC agonists increase the levels of P-TEFb and favour the release of P-TEFb from its inactive complex (Bartholomeeusen et al., 2013; Fujinaga et al., 2012; Pandelo Jose et al., 2014; Sung and Rice, 2006). We observed that baseline levels of pCDK9 were the lowest in naïve cells, which is consistent with their lower transcriptional activity compared to memory subsets (Durek et al., 2016). PKC agonists were more potent at inducing CDK9 phosphorylation in T_{EM} cells compared to less differentiated subsets, which may contribute to their capacity to mount immediate effector responses following antigen stimulation (Sallusto et al., 2004; Sallusto et al., 1999).

Several cellular miRNAs have been reported to exert an inhibitory effect on HIV-1 replication by targeting host cell HIV dependency factors (mi-R27b, 29b, 150, 155, 223) and/or by directly targeting HIV transcripts (miR28, 29b, 125b, 196b, 223) (Rice, 2015). Our results indicate that miR125b is expressed at lower levels in the more differentiated subsets which is in line with previous studies showing that CD4 activation is associated with a downregulation of this miRNA and increased HIV replication (Huang et al., 2007). Therefore, the lower levels of miR125b in T_{EM} cells may contribute to their heightened susceptibility to HIV infection (Groot et al., 2006). The opposite trend was observed when we measured miR155, which was expressed at higher levels in the more differentiated subsets. miR155 is known to suppress the expression of the HIV activator TRIM32, which activates NF- κ B by inducing the degradation of its inhibitor I κ B (Ruelas et al., 2015). Therefore, the heightened expression of miR155 in T_{EM} cells is consistent with the lower levels of active NF- κ B we measured in this subset.

LRAs from several classes have been evaluated *in vivo* for their ability to reactivate HIV from latency. Disappointingly, most of these clinical interventions failed at reducing the size of the HIV reservoir (Archin et al., 2010; Archin et al., 2008; Archin et al., 2017; Archin et al., 2012; Delagreverie et al., 2016; Elliott et al., 2014; Gutierrez et al., 2016; Rasmussen et al., 2014; Routy et al., 2012; Sagot-Lerolle et al., 2008; Siliciano et al., 2007; Sogaard et al., 2015). This suggests that LRAs alone may not be potent enough to reactivate all latently infected cells or to induce sufficiently high levels of viral antigens for subsequent killing of these infected cells. Several studies have shown that combinations of LRAs are more efficient at reactivating HIV from latency than LRAs alone in cell lines and *ex vivo* cell cultures from ART-treated individuals (Darcis et al., 2015; Laird et al., 2015; Martinez-Bonet et al., 2015). Our results indicate that LRAs from the same class often display different activities in distinct subsets of memory CD4⁺ T cells, suggesting that using multiple LRAs from the same family may increase the likelihood of targeting multiple reservoirs simultaneously. Moreover, and as shown previously in several studies, our results suggest that some of these LRAs synergize to reverse HIV latency (Darcis et al., 2015; Jiang et

al., 2015; Laird et al., 2015; Martinez-Bonet et al., 2015; Spivak and Planelles, 2018). Our study sheds new light on this phenomenon since we characterized the cell subsets in which this synergism may be critical for successful latency reversal. Indeed, we took advantage of a new flow-cytometry based assay (HIV-Flow) to determine the frequency of p24-producing cells in total CD4 T cells and memory CD4 T cell subsets after reactivation with LRAs alone or in combination. High doses of panobinostat, romidepsin and JQ-1 had minimal impact on HIV reactivation in total CD4 T cells, while the PKC agonist ingenol reactivated HIV in samples from all participants. This is in line with the study by Bullen *et al.* showing that at clinically relevant concentrations, only PKC agonists are able to increase virus release and intracellular HIV-1 mRNA (Bullen et al., 2014). As expected, combinations of a PKC agonist with an HDACi induced higher levels of viral reactivation than LRAs alone. Darcis *et al.* (Darcis et al., 2015) and Laird *et al.* (Laird et al., 2015) showed that the addition of JQ-1 to PKC agonists improved viral production. In our study, the addition of JQ-1 to the combination of panobinostat and ingenol did not increase reactivation. The high doses of panobinostat and ingenol used in our study may not have allowed us to observe the additional effect of JQ-1. Interestingly, even when used at high doses, LRAs combinations only reached 30% of the maximal reactivation obtained with PMA/ionomycin, questioning the possibility of achieving latency reversal in all infected cells with currently available LRAs.

Following reactivation with PMA/ionomycin and ingenol alone or in combination, the T_{TM} and T_{EM} subsets often encompassed higher frequencies of p24+ cells than T_{CM} cells. This is consistent with the data obtained by Lassen *et al.* in a primary cell model of HIV latency (Lassen et al., 2012) and with the higher frequency of cells harbouring intact HIV proviruses in the T_{EM} subset (Hiener et al., 2017). Of note, ingenol alone failed to induce p24 production in T_{CM} cells from 4 out of 9 participants. This is likely attributed to the low contribution of this subset to the pool of latently infected cells in these individuals (<3%, data not shown), which highlights the need to study samples from participants with various contributions of T_{CM}, T_{TM} and T_{EM} cells to the total reservoir to adequately assess latency reversal in all cellular reservoirs.

Finally, our study reveals that combining panobinostat or romidepsin with ingenol dramatically increased latency reversal in T_{CM} cells to levels similar or even higher to those obtained with PMA/ionomycin. Of note, these combinations only had a modest effect in the T_{TM} and T_{EM} subsets when compared to PMA/ionomycin reactivation. This suggests that histone hypoacetylation may be a major contributor to HIV latency in T_{CM} cells whereas this mechanism may be less involved in the silencing of HIV genomes in T_{TM} and T_{EM} cells. Future studies will be needed to identify a combination of LRAs inducing reactivation of HIV as efficiently as PMA/ionomycin not only in T_{CM} cells but in all subsets of memory CD4 T cells.

In conclusion, this study highlights the importance of considering the HIV reservoir as multiple and heterogeneous pools of latently infected cells that respond differently to LRA and paves the way for the development of a combination of LRAs that would reactivate latent HIV in all subsets.

Acknowledgements

The study team is grateful to the individuals who volunteered to participate in this study. The authors thank Josée Girouard, Mario Legault, Moti Ramgopal and Brenda Jacobs for recruitment and clinical assistance with study participants, Jessica Brehm for the initial development of the histone staining and for critical advices as well as Jonathan Karn and Curtis Dobrowolski for providing the Anti-pS175 CDK9 antibody and for helpful discussions. We also thank the flow cytometry core at the CRCHUM, managed by Dominique Gauchat and Philippe St-Onge; the pharmacokinetics core, managed by Fleur Gaudette; and the NC3 core, managed by Olfa Debbeche.

Author Contributions

M.P., R.F and N.C. designed the assays. M.P. and A.P. performed the experiments. M.P. analyzed the data. J.P.R. recruited the participants. M.P. wrote the original manuscript. N.C. designed the study, supervised the work and edited the manuscript with contributions from all co-authors.

Funding

This work was supported by the Canadian Institutes for Health Research (CIHR, #364408, #377124 and #385806), the Delaney AIDS Research Enterprise (DARE) to Find a Cure (UM1AI126611), the Foundation for AIDS Research (amfAR, Research Consortium on HIV Eradication 108687-54-RGRL and 108928-56-RGRL), the réseau SIDA et maladies infectieuses du Fonds de Recherche du Québec - Santé (FRQS) and The Canadian HIV Cure Enterprise Team Grant HIG-133050 from the CIHR in partnership with CANFAR and IAS. NC is supported by Research Scholar Career Awards of the Quebec Health Research Fund (FRQ-S, NC: #253292). JPR is the holder of the Louis Lowenstein Chair in Hematology and Oncology, McGill University. MP is supported by a fellowship from Wallonie Bruxelles International.

Declaration of Interests

The authors have declared that no competing interests exist.

Material and methods

Study group

Samples from 18 HIV-infected individuals on stably suppressive ART for a median time of 9.3 years were used in this study. All participants signed informed consent forms approved by the McGill University Health Centre, the Centre Hospitalier de l'Université de Montréal and the Martin Memorial Health Systems review boards. Participants characteristics are summarized in Table 1. All participants underwent leukapheresis to collect large numbers of PBMCs. PBMCs were isolated by Ficoll density gradient centrifugation and were cryopreserved in liquid nitrogen.

Latency reversing agents

Panobinostat (S1030) and romidepsin (S3020) were obtained from Selleckchem. Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA, P8139), ionomycin (I9657), ingenol-3-angelate (SML-1318) and prostratin (P0077) were obtained from Sigma-Aldrich. Bryostatins were obtained from Enzo Life Sciences (BML-ST103-0010). Vorinostat was provided by Merck. JQ-1 was obtained from BioVision (2070). All compounds were resuspended in DMSO and stored at -20°C or -80°C until use.

Antibodies

Live/Dead Aqua Cell Stain (L/D) (405nm) was obtained from Thermo Fisher Scientific (L34957). Antibodies to cell surface receptors (CD3, CD4, CD8, CD45RA, CD27, CCR7) are listed in Supplementary Table 1. Anti-acetyl histone H3 was obtained from Cell Signaling Technology (9683S) and anti-acetyl H4 (05-1355) was obtained from EMD Millipore. Anti-pS529 p65 NF- κ B was obtained from BD Bioscience (558423). Anti-pS175 CDK9 was kindly provided by Jonathan Karn. KC57-PE was obtained from Beckman Coulter (6604667) and p24 28B7-APC was obtained from MediMabs (MM-0289-APC).

Antibody labeling

Anti-acetyl H4 and anti-pS175 CDK9 were labeled with the Mix-n-Stain CF647 Antibody Labeling kit from Sigma-Aldrich (MX647S100) according to the manufacturer's instructions.

Gating strategy for flow cytometry analysis

Live CD4⁺ T cells were defined as (CD3⁺/L/D⁻/CD8⁻/CD4⁺). CD4 T cell subsets were defined using the following gating strategy: T_N (CD45RA⁺/CD27⁺/CCR7⁺); T_{CM} (CD45RA⁻/CD27⁺/CCR7⁺); T_{TM} (CD45RA⁻/CD27⁺/CCR7⁻); T_{EM} (CD45RA⁻/CD27⁻/CCR7⁻) and T_{TD} (CD45RA⁺/CD27⁻/CCR7⁻).

Measure of histones H3 and H4 acetylation

PBMCs were exposed to 4nM-62.5 μ M vorinostat, 0.04nM-625nM panobinostat and 0.15nM-640nM romidepsin for 4h at 37°C in complete culture medium. Cells were washed and stained (45min, 4°C) with the Aqua LIVE/DEAD staining kit together with antibodies to cell surface proteins (CD3, CD4, CD8, CD45RA, CD27, CCR7). After a 15min-fixation step with formaldehyde 4% (Fischer Scientific, F79-500), cells were permeabilized (45min, 4°C) with the Perm Wash buffer (BD Biosciences, 554723), and stained (45min, RT) with anti-acetylated H3 and H4 antibodies. Levels of acetylated H3 and H4 in gated subsets of CD4 T cells were determined by flow cytometry on a BD LSR II.

Measure of NF- κ B activation

PBMCs were rested overnight in complete medium (RPMI 1640, Life Technologies) supplemented with 10% Fetal Bovine Serum (Wisent) and 1% Penicillin/Streptomycin (Life Technologies) and exposed to 0.27nM-350nM PMA, 0.69nM-900nM bryostatin, 0.69nM-900nM ingenol or 0.069 μ M-90 μ M prostratin for 15min at 37°C in PBS/2% Human Serum (Atlanta Biologicals, 540110). Antibody to CCR7 and LIVE/DEAD reagent were added to the culture medium during the stimulation. Cells were then fixed (10min, 37°C) with the Cytofix Fixation Buffer (BD Biosciences, 554655) and stained (1h, room temperature) with antibodies to cell surface markers (CD3, CD4, CD8 and CD27). Cells were permeabilized (20min, on ice) with the ice-cold Permeabilization Buffer III (BD Biosciences, 558050), and rehydrated (15min, on ice) in PBS/Human Serum 10%. Finally, PBMCs were stained (30min, RT) with anti-pS129 NF- κ B and anti-CD45RA antibodies. Levels of pNF- κ B in gated subsets of CD4 T cells were determined by flow cytometry on a BD LSR II.

Measure of P-TEFb activation

PBMCs were rested overnight in complete medium (RPMI 1640, Life Technologies) supplemented with 10% Fetal Bovine Serum (Wisent) and 1% Penicillin/Streptomycin (Life Technologies). After a 20min-incubation at 4°C, cells were exposed to 10 μ M JQ-1, 0.08nM-250nM bryostatin or 0.08nM-250nM ingenol for 30min at 37°C in PBS/2% Human Serum. Cells were then stained (30min, 4°C) with the Aqua LIVE/DEAD staining kit together with antibodies for cell surface markers (CD3, CD4, CD8, CD45RA, CD27, CCR7). After a 20min-fixation with methanol free formaldehyde 4% (Polysciences, 04018-1), cells were permeabilized (30min, 4°C) with the Perm Wash buffer (BD Biosciences, 554723) and stained (30min, RT) with the anti-pS175 CDK9 antibody. Levels of pCDK9 in gated subsets of CD4 T cells were determined by flow cytometry on a BD LSR II.

Measures of miRNA levels

200x10⁶ PBMCs from 5 participants were used to isolate CD4 T cells by negative magnetic selection with the EasySep™ Human CD4 T Cell Enrichment Kit (StemCell technology, 19052). Purified CD4 T cells were stained with Aqua LIVE/DEAD, CD3, CD4, CD45RA, CD27 and CCR7 in order to sort the T_N, T_{CM}, T_{TM} and T_{EM} subsets on a BD Aria III. After sorting, between 1-3x10⁵ cells from each subset were used for quantification of integrated DNA and the remaining cells were used for RNA extraction (mirVana miRNA Isolation Kit, ThermoFisher, AM1560). RNAs from each subset were polyadenylated and retrotranscribed according to the manufacturer's instructions (miRNA 1st strand cDNA Synthesis kit, Agilent Technologies, 600036). Quantitative real time PCR (PowerUp SYBRGreen Master Mix, Thermo Fisher, A2574) was used to quantify each miRNA and GAPDH was used as reference gene. Sequences of oligonucleotides used to amplify miRNA were designed as previously described by Balcells *et al.* (Balcells et al., 2011) and are indicated in Supplementary Table 2. Amplification of miRNA and GAPDH was carried out in a 10- μ l reaction mixture comprising 2 μ L cDNA, 5 μ L SYBRGreen Master Mix, and 1 μ L of the forward and reverse primers (500nM). The PCR cycle conditions were as follows: Uracil-DNA glycosylase (UDG) activation at 50°C for 2min, Taq polymerase activation at 95°C for 2min, and 50 cycles of amplification (95°C for 1s, 60°C for 30s), followed by a melt curve analysis (95°C for 15s, 60°C for 1min, 95°C for 15s). Amplification was performed on the QuantStudio5 instrument (Applied Biosystems). Relative expression of miRNA in each subset was determined following normalization on the levels of GAPDH transcripts.

Quantification of integrated HIV DNA

Quantification of integrated HIV DNA was performed by Alu real-time nested PCR as described previously (Vandergeeten et al., 2014). Briefly, CD4 T cells from each subset were digested with proteinase K. A first round of PCR pre-amplification (12 cycles) was performed directly on cell lysates using a primer specific for the LTR region (ULF1) together with two alu primers. A nested real-time PCR was then carried out on a Rotor-Gene Q instrument (Qiagen, Mississauga, Canada) using inner primers and a TaqMan probe. The number of copies of the CD3 gene was determined to accurately quantify the number of cells in each reaction. Results were expressed as HIV DNA copies per 10⁶ CD4 T cells.

Determination of HDACi uptake in CD4 T cell subsets

400x10⁶ PBMCs from 2 participants were thawed and T_N, T_{CM}, T_{TM} and T_{EM} subsets were sorted as described above on a BD Aria III. Each subset was exposed to 500nM vorinostat, 5nM panobinostat, and 10nM romidepsin for 4h at 37°C in complete medium. Intracellular concentration of each drug in each subset was determined by liquid chromatography–mass

spectrometry (LC-MS/MS) analysis. Briefly, protein precipitation with methanol was used to extract LRAs from CD4 T cells. 10ng/mL glibenclamide was used as internal standard solution for all LRAs. For vorinostat and panobinostat, 50 μ L of internal standard solution were added to 200 μ L of cell lysate. The mobile phase consisted of 0.1% formic acid in acetonitrile (A) and 10mM ammonium formate pH 3 (B); ratio A:B varied from 8:92 to 90:10 (v/v), at a flow rate of 300 μ L/min. 10 μ L of the extract were injected into LC-MSMS system. For romidepsin, 250 μ L of internal standard solution were added to 500 μ L of cell lysate. The solution was evaporated to dryness at 50°C under a gentle stream of nitrogen and reconstituted with 100 μ L of methanol. The mobile phase consisted of acetonitrile (A) and 0.01% formic acid (B); ratio A:B varied from 8:92 to 90:10 (v/v), at a flow rate of 300 μ L/min. 5 μ L of the extract were injected into LC-MSMS system. The mass spectrometer (Thermo Scientific TSQ Quantiva Triple Quadrupole) was interfaced with ultra-performance liquid chromatography (UPLC) system (Thermo Scientific UltiMate 3000 XRS) using a pneumatic assisted heated electrospray ion source. MS detection was performed in positive ion mode, using selected reaction monitoring.

Quantification of p24+ cells

Quantification and characterization of p24+ cells were performed by using the HIV-Flow procedure as previously described (Pardons et al., 2019). Briefly, CD4 T cells were isolated by negative magnetic selection as described above and resuspended at 2x10⁶ cells/mL in RPMI + 10% Fetal Bovine Serum with antiretroviral drugs (200nM raltegravir, 200nM lamivudine). Cells were pre-incubated for 1h with 5 μ g/mL Brefeldin A (Sigma, B2651) and BFA was maintained in the culture until the end of the stimulation. As a positive control, cells were stimulated with 162nM PMA and 1 μ g/mL ionomycin for 24h. To test the ability of different LRAs at inducing p24 expression, cells were exposed to 100nM panobinostat, 100nM romidepsin, 10 μ M JQ-1, 500nM ingénol, alone or in combination. After 24h of stimulation, cells were collected, resuspended in PBS and stained with the Aqua L/D staining kit for 30min at 4°C. Cells were then stained with antibodies for CD3, CD4, CD8, CD45RA, CCR7, CD27 in PBS + 4% human serum for 30min at 4°C. Cells were fixed and permeabilized for 45min at 4°C using the FoxP3 Transcription Factor Staining Buffer Set (eBioscience, 00-5523-00), and stained with anti-p24 (clone KC57) and anti-p24 (clone 28B7) antibodies for an additional 45min at room temperature. The frequency of p24+ cells (KC57+, 28B7+) was determined by flow cytometry (BD LSR II) in gated CD8 negative T cells (CD3+CD8-). In all experiments, purified CD4 T cells from an HIV-negative control were included to set the threshold of positivity.

Statistical analyses

All data were analyzed using Graphpad Prism v6.0h. To determine the top plateau of dose response curves, a nonlinear regression [log(agonist) vs. response (3 parameters)] was applied to the data. To determine the EC50, data were normalized with the lowest and highest values defined as 0% and 100% respectively, and a nonlinear regression [log(agonist) vs. normalized response (variable slope)] was applied to the data. For comparisons between CD4 T cell subsets, Friedman tests with Dunn's correction for multiple comparisons were used.

References

- Archin, N.M., Cheema, M., Parker, D., Wiegand, A., Bosch, R.J., Coffin, J.M., Eron, J., Cohen, M., and Margolis, D.M. (2010). Antiretroviral intensification and valproic acid lack sustained effect on residual HIV-1 viremia or resting CD4+ cell infection. *PLoS One* 5, e9390.
- Archin, N.M., Eron, J.J., Palmer, S., Hartmann-Duff, A., Martinson, J.A., Wiegand, A., Bandarenko, N., Schmitz, J.L., Bosch, R.J., Landay, A.L., *et al.* (2008). Valproic acid without intensified antiviral therapy has limited impact on persistent HIV infection of resting CD4+ T cells. *AIDS* 22, 1131-1135.
- Archin, N.M., Espeseth, A., Parker, D., Cheema, M., Hazuda, D., and Margolis, D.M. (2009). Expression of latent HIV induced by the potent HDAC inhibitor suberoylanilide hydroxamic acid. *AIDS Res Hum Retroviruses* 25, 207-212.
- Archin, N.M., Kirchherr, J.L., Sung, J.A., Clutton, G., Sholtis, K., Xu, Y., Allard, B., Stuelke, E., Kashuba, A.D., Kuruc, J.D., *et al.* (2017). Interval dosing with the HDAC inhibitor vorinostat effectively reverses HIV latency. *J Clin Invest* 127, 3126-3135.
- Archin, N.M., Liberty, A.L., Kashuba, A.D., Choudhary, S.K., Kuruc, J.D., Crooks, A.M., Parker, D.C., Anderson, E.M., Kearney, M.F., Strain, M.C., *et al.* (2012). Administration of vorinostat disrupts HIV-1 latency in patients on antiretroviral therapy. *Nature* 487, 482-485.
- Baeuerle, P.A., and Baltimore, D. (1988). I kappa B: a specific inhibitor of the NF-kappa B transcription factor. *Science* 242, 540-546.
- Balcells, I., Cirera, S., and Busk, P.K. (2011). Specific and sensitive quantitative RT-PCR of miRNAs with DNA primers. *BMC Biotechnol* 11, 70.
- Barski, A., Cuddapah, S., Kartashov, A.V., Liu, C., Imamichi, H., Yang, W., Peng, W., Lane, H.C., and Zhao, K. (2017). Rapid Recall Ability of Memory T cells is Encoded in their Epigenome. *Sci Rep* 7, 39785.
- Bartholomeeusen, K., Fujinaga, K., Xiang, Y., and Peterlin, B.M. (2013). Histone deacetylase inhibitors (HDACis) that release the positive transcription elongation factor b (P-TEFb) from its inhibitory complex also activate HIV transcription. *J Biol Chem* 288, 14400-14407.
- Bartholomeeusen, K., Xiang, Y., Fujinaga, K., and Peterlin, B.M. (2012). Bromodomain and extra-terminal (BET) bromodomain inhibition activate transcription via transient release of positive transcription elongation factor b (P-TEFb) from 7SK small nuclear ribonucleoprotein. *J Biol Chem* 287, 36609-36616.
- Beans, E.J., Fournogerakis, D., Gauntlett, C., Heumann, L.V., Kramer, R., Marsden, M.D., Murray, D., Chun, T.W., Zack, J.A., and Wender, P.A. (2013). Highly potent, synthetically accessible prostratin analogs induce latent HIV expression in vitro and ex vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, 11698-11703.

Benhadji, K.A., Serova, M., Ghoul, A., Cvitkovic, E., Le Tourneau, C., Ogbourne, S.M., Lokiec, F., Calvo, F., Hammel, P., Faivre, S., *et al.* (2008). Antiproliferative activity of PEP005, a novel ingenol angelate that modulates PKC functions, alone and in combination with cytotoxic agents in human colon cancer cells. *Br J Cancer* 99, 1808-1815.

Blazkova, J., Trejbalova, K., Gondois-Rey, F., Halfon, P., Philibert, P., Guiguen, A., Verdin, E., Olive, D., Van Lint, C., Hejnar, J., *et al.* (2009). CpG methylation controls reactivation of HIV from latency. *PLoS Pathog* 5, e1000554.

Bogi, K., Lorenzo, P.S., Szallasi, Z., Acs, P., Wagner, G.S., and Blumberg, P.M. (1998). Differential selectivity of ligands for the C1a and C1b phorbol ester binding domains of protein kinase Cdelta: possible correlation with tumor-promoting activity. *Cancer Res* 58, 1423-1428.

Budhiraja, S., and Rice, A.P. (2013). Reactivation of latent HIV: do all roads go through P-TEFb? *Future Virol* 8.

Bullen, C.K., Laird, G.M., Durand, C.M., Siliciano, J.D., and Siliciano, R.F. (2014). New ex vivo approaches distinguish effective and ineffective single agents for reversing HIV-1 latency in vivo. *Nat Med* 20, 425-429.

Buzon, M.J., Sun, H., Li, C., Shaw, A., Seiss, K., Ouyang, Z., Martin-Gayo, E., Leng, J., Henrich, T.J., Li, J.Z., *et al.* (2014). HIV-1 persistence in CD4+ T cells with stem cell-like properties. *Nat Med* 20, 139-142.

Chiang, K., Sung, T.L., and Rice, A.P. (2012). Regulation of cyclin T1 and HIV-1 Replication by microRNAs in resting CD4+ T lymphocytes. *J Virol* 86, 3244-3252.

Chomont, N., El-Far, M., Ancuta, P., Trautmann, L., Procopio, F.A., Yassine-Diab, B., Boucher, G., Boulassel, M.R., Ghattas, G., Brechley, J.M., *et al.* (2009). HIV reservoir size and persistence are driven by T cell survival and homeostatic proliferation. *Nat Med* 15, 893-900.

Chun, T.W., Engel, D., Berrey, M.M., Shea, T., Corey, L., and Fauci, A.S. (1998a). Early establishment of a pool of latently infected, resting CD4(+) T cells during primary HIV-1 infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 8869-8873.

Chun, T.W., Engel, D., Mizell, S.B., Ehler, L.A., and Fauci, A.S. (1998b). Induction of HIV-1 replication in latently infected CD4+ T cells using a combination of cytokines. *J Exp Med* 188, 83-91.

Chun, T.W., Stuyver, L., Mizell, S.B., Ehler, L.A., Mican, J.A., Baseler, M., Lloyd, A.L., Nowak, M.A., and Fauci, A.S. (1997). Presence of an inducible HIV-1 latent reservoir during highly active antiretroviral therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 13193-13197.

Cillo, A.R., and Mellors, J.W. (2016). Which therapeutic strategy will achieve a cure for HIV-1? *Curr Opin Virol* 18, 14-19.

Clutton, G.T., and Jones, R.B. (2018). Diverse Impacts of HIV Latency-Reversing Agents on CD8+ T-Cell Function: Implications for HIV Cure. *Front Immunol* 9, 1452.

Colin, L., and Van Lint, C. (2009). Molecular control of HIV-1 postintegration latency: implications for the development of new therapeutic strategies. *Retrovirology* 6, 111.

Coull, J.J., Romerio, F., Sun, J.M., Volker, J.L., Galvin, K.M., Davie, J.R., Shi, Y., Hansen, U., and Margolis, D.M. (2000). The human factors YY1 and LSF repress the human immunodeficiency virus type 1 long terminal repeat via recruitment of histone deacetylase 1. *J Virol* 74, 6790-6799.

Darcis, G., Kula, A., Bouchat, S., Fujinaga, K., Corazza, F., Ait-Ammar, A., Delacourt, N., Melard, A., Kabeya, K., Vanhulle, C., *et al.* (2015). An In-Depth Comparison of Latency-Reversing Agent Combinations in Various In Vitro and Ex Vivo HIV-1 Latency Models Identified Bryostatins-1+JQ1 and Ingenol-B+JQ1 to Potently Reactivate Viral Gene Expression. *PLoS Pathog* 11, e1005063.

Deeks, S.G., Lewin, S.R., Ross, A.L., Ananworanich, J., Benkirane, M., Cannon, P., Chomont, N., Douek, D., Lifson, J.D., Lo, Y.R., *et al.* (2016). International AIDS Society global scientific strategy: towards an HIV cure 2016. *Nat Med* 22, 839-850.

Delagreverie, H.M., Delaugerre, C., Lewin, S.R., Deeks, S.G., and Li, J.Z. (2016). Ongoing Clinical Trials of Human Immunodeficiency Virus Latency-Reversing and Immunomodulatory Agents. *Open Forum Infect Dis* 3, ofw189.

Desimio, M.G., Giuliani, E., Ferraro, A.S., Adorno, G., and Doria, M. (2018). In Vitro Exposure to Prostratin but Not Bryostatins-1 Improves Natural Killer Cell Functions Including Killing of CD4(+) T Cells Harboring Reactivated Human Immunodeficiency Virus. *Front Immunol* 9, 1514.

Durek, P., Nordstrom, K., Gasparoni, G., Salhab, A., Kressler, C., de Almeida, M., Bassler, K., Ulas, T., Schmidt, F., Xiong, J., *et al.* (2016). Epigenomic Profiling of Human CD4(+) T Cells Supports a Linear Differentiation Model and Highlights Molecular Regulators of Memory Development. *Immunity* 45, 1148-1161.

Elliott, J.H., Wightman, F., Solomon, A., Ghneim, K., Ahlers, J., Cameron, M.J., Smith, M.Z., Spelman, T., McMahon, J., Velayudham, P., *et al.* (2014). Activation of HIV transcription with short-course vorinostat in HIV-infected patients on suppressive antiretroviral therapy. *PLoS Pathog* 10, e1004473.

Finzi, D., Blankson, J., Siliciano, J.D., Margolick, J.B., Chadwick, K., Pierson, T., Smith, K., Lisziewicz, J., Lori, F., Flexner, C., *et al.* (1999). Latent infection of CD4+ T cells provides a mechanism for lifelong persistence of HIV-1, even in patients on effective combination therapy. *Nat Med* 5, 512-517.

Finzi, D., Hermankova, M., Pierson, T., Carruth, L.M., Buck, C., Chaisson, R.E., Quinn, T.C., Chadwick, K., Margolick, J., Brookmeyer, R., *et al.* (1997). Identification of a reservoir for HIV-1 in patients on highly active antiretroviral therapy. *Science* 278, 1295-1300.

Fujinaga, K., Barboric, M., Li, Q., Luo, Z., Price, D.H., and Peterlin, B.M. (2012). PKC phosphorylates HEXIM1 and regulates P-TEFb activity. *Nucleic Acids Res* 40, 9160-9170.

Fujinaga, K., Luo, Z., Schaufele, F., and Peterlin, B.M. (2015). Visualization of positive transcription elongation factor b (P-TEFb) activation in living cells. *J Biol Chem* 290, 1829-1836.

Groot, F., van Capel, T.M., Schuitemaker, J., Berkhout, B., and de Jong, E.C. (2006). Differential susceptibility of naive, central memory and effector memory T cells to dendritic cell-mediated HIV-1 transmission. *Retrovirology* 3, 52.

Gutierrez, C., Serrano-Villar, S., Madrid-Elena, N., Perez-Elias, M.J., Martin, M.E., Barbas, C., Ruiperez, J., Munoz, E., Munoz-Fernandez, M.A., Castor, T., *et al.* (2016). Bryostatins for latent virus reactivation in HIV-infected patients on antiretroviral therapy. *AIDS* 30, 1385-1392.

Hiener, B., Horsburgh, B.A., Eden, J.S., Barton, K., Schlub, T.E., Lee, E., von Stockenstrom, S., Odevall, L., Milush, J.M., Liegler, T., *et al.* (2017). Identification of Genetically Intact HIV-1 Proviruses in Specific CD4(+) T Cells from Effectively Treated Participants. *Cell Rep* 21, 813-822.

Hoque, M., Shamanna, R.A., Guan, D., Pe'ery, T., and Mathews, M.B. (2011). HIV-1 replication and latency are regulated by translational control of cyclin T1. *J Mol Biol* 410, 917-932.

Huang, J., Wang, F., Argyris, E., Chen, K., Liang, Z., Tian, H., Huang, W., Squires, K., Verlinghieri, G., and Zhang, H. (2007). Cellular microRNAs contribute to HIV-1 latency in resting primary CD4+ T lymphocytes. *Nat Med* 13, 1241-1247.

Imai, K., and Okamoto, T. (2006). Transcriptional repression of human immunodeficiency virus type 1 by AP-4. *J Biol Chem* 281, 12495-12505.

Jaafoura, S., de Goer de Herve, M.G., Hernandez-Vargas, E.A., Hendel-Chavez, H., Abdoh, M., Mateo, M.C., Krzysiek, R., Merad, M., Seng, R., Tardieu, M., *et al.* (2014). Progressive contraction of the latent HIV reservoir around a core of less-differentiated CD4(+) memory T Cells. *Nat Commun* 5, 5407.

Jiang, G., and Dandekar, S. (2015). Targeting NF-kappaB signaling with protein kinase C agonists as an emerging strategy for combating HIV latency. *AIDS Res Hum Retroviruses* 31, 4-12.

Jiang, G., Espeseth, A., Hazuda, D.J., and Margolis, D.M. (2007). c-Myc and Sp1 contribute to proviral latency by recruiting histone deacetylase 1 to the human immunodeficiency virus type 1 promoter. *J Virol* 81, 10914-10923.

Jiang, G., Mendes, E.A., Kaiser, P., Wong, D.P., Tang, Y., Cai, I., Fenton, A., Melcher, G.P., Hildreth, J.E., Thompson, G.R., *et al.* (2015). Synergistic Reactivation of Latent HIV Expression by Ingenol-3-Angelate, PEP005, Targeted NF-kB Signaling in Combination with JQ1 Induced p-TEFb Activation. *PLoS Pathog* 11, e1005066.

Jones, R.B., O'Connor, R., Mueller, S., Foley, M., Szeto, G.L., Karel, D., Lichterfeld, M., Kovacs, C., Ostrowski, M.A., Trocha, A., *et al.* (2014). Histone deacetylase inhibitors impair the elimination of HIV-infected cells by cytotoxic T-lymphocytes. *PLoS Pathog* 10, e1004287.

Kauder, S.E., Bosque, A., Lindqvist, A., Planelles, V., and Verdin, E. (2009). Epigenetic regulation of HIV-1 latency by cytosine methylation. *PLoS Pathog* 5, e1000495.

Laird, G.M., Bullen, C.K., Rosenbloom, D.I., Martin, A.R., Hill, A.L., Durand, C.M., Siliciano, J.D., and Siliciano, R.F. (2015). Ex vivo analysis identifies effective HIV-1 latency-reversing drug combinations. *J Clin Invest* 125, 1901-1912.

Lassen, K.G., Hebbeler, A.M., Bhattacharyya, D., Lobritz, M.A., and Greene, W.C. (2012). A flexible model of HIV-1 latency permitting evaluation of many primary CD4 T-cell reservoirs. *PLoS One* 7, e30176.

Lehrman, G., Hogue, I.B., Palmer, S., Jennings, C., Spina, C.A., Wiegand, A., Landay, A.L., Coombs, R.W., Richman, D.D., Mellors, J.W., *et al.* (2005). Depletion of latent HIV-1 infection in vivo: a proof-of-concept study. *Lancet* 366, 549-555.

Luo, J.L., Kamata, H., and Karin, M. (2005). IKK/NF-kappaB signaling: balancing life and death-- a new approach to cancer therapy. *J Clin Invest* 115, 2625-2632.

Macallan, D.C., Wallace, D., Zhang, Y., De Lara, C., Worth, A.T., Ghattas, H., Griffin, G.E., Beverley, P.C., and Tough, D.F. (2004). Rapid turnover of effector-memory CD4(+) T cells in healthy humans. *J Exp Med* 200, 255-260.

Marban, C., Suzanne, S., Dequiedt, F., de Walque, S., Redel, L., Van Lint, C., Aunis, D., and Rohr, O. (2007). Recruitment of chromatin-modifying enzymes by CTIP2 promotes HIV-1 transcriptional silencing. *EMBO J* 26, 412-423.

Martinez-Bonet, M., Clemente, M.I., Serramia, M.J., Munoz, E., Moreno, S., and Munoz-Fernandez, M.A. (2015). Synergistic Activation of Latent HIV-1 Expression by Novel Histone Deacetylase Inhibitors and Bryostatins. *Sci Rep* 5, 16445.

Masopust, D., Vezys, V., Marzo, A.L., and Lefrancois, L. (2001). Preferential localization of effector memory cells in nonlymphoid tissue. *Science* 291, 2413-2417.

Mbonye, U.R., Gokulrangan, G., Datt, M., Dobrowolski, C., Cooper, M., Chance, M.R., and Karn, J. (2013). Phosphorylation of CDK9 at Ser175 enhances HIV transcription and is a marker of activated P-TEFb in CD4(+) T lymphocytes. *PLoS Pathog* 9, e1003338.

Mehla, R., Bivalkar-Mehla, S., Zhang, R., Handy, I., Albrecht, H., Giri, S., Nagarkatti, P., Nagarkatti, M., and Chauhan, A. (2010). Bryostatins modulate latent HIV-1 infection via PKC and AMPK signaling but inhibit acute infection in a receptor independent manner. *PLoS One* 5, e11160.

Nguyen, V.T., Kiss, T., Michels, A.A., and Bensaude, O. (2001). 7SK small nuclear RNA binds to and inhibits the activity of CDK9/cyclin T complexes. *Nature* 414, 322-325.

Ni, X., Li, L., and Pan, G. (2015). HDAC inhibitor-induced drug resistance involving ATP-binding cassette transporters (Review). *Oncol Lett* 9, 515-521.

Okada, R., Kondo, T., Matsuki, F., Takata, H., and Takiguchi, M. (2008). Phenotypic classification of human CD4+ T cell subsets and their differentiation. *Int Immunol* 20, 1189-1199.

Palella, F.J., Jr., Delaney, K.M., Moorman, A.C., Loveless, M.O., Fuhrer, J., Satten, G.A., Aschman, D.J., and Holmberg, S.D. (1998). Declining morbidity and mortality among patients with advanced human immunodeficiency virus infection. HIV Outpatient Study Investigators. *N Engl J Med* 338, 853-860.

Palmer, S., Maldarelli, F., Wiegand, A., Bernstein, B., Hanna, G.J., Brun, S.C., Kempf, D.J., Mellors, J.W., Coffin, J.M., and King, M.S. (2008). Low-level viremia persists for at least 7 years in patients on suppressive antiretroviral therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 3879-3884.

Pandelo Jose, D., Bartholomeeusen, K., da Cunha, R.D., Abreu, C.M., Glinski, J., da Costa, T.B., Bacchi Rabay, A.F., Pianowski Filho, L.F., Dudycz, L.W., Ranga, U., *et al.* (2014). Reactivation of latent HIV-1 by new semi-synthetic ingenol esters. *Virology* 462-463, 328-339.

Pardons, M., Baxter, A.E., Massanella, M., Pagliuzza, A., Fromentin, R., Dufour, C., Leyre, L., Routy, J.P., Kaufmann, D.E., and Chomont, N. (2019). Single-cell characterization and quantification of translation-competent viral reservoirs in treated and untreated HIV infection. *PLoS Pathog* 15, e1007619.

Ramakrishnan, R., Dow, E.C., and Rice, A.P. (2009). Characterization of Cdk9 T-loop phosphorylation in resting and activated CD4(+) T lymphocytes. *J Leukoc Biol* 86, 1345-1350.

Rao, A., Luo, C., and Hogan, P.G. (1997). Transcription factors of the NFAT family: regulation and function. *Annu Rev Immunol* 15, 707-747.

Rasmussen, T.A., Tolstrup, M., Brinkmann, C.R., Olesen, R., Erikstrup, C., Solomon, A., Winckelmann, A., Palmer, S., Dinarello, C., Buzon, M., *et al.* (2014). Panobinostat, a histone deacetylase inhibitor, for latent-virus reactivation in HIV-infected patients on suppressive antiretroviral therapy: a phase 1/2, single group, clinical trial. *Lancet HIV* 1, e13-21.

Reinhardt, R.L., Khoruts, A., Merica, R., Zell, T., and Jenkins, M.K. (2001). Visualizing the generation of memory CD4 T cells in the whole body. *Nature* 410, 101-105.

Rice, A.P. (2015). Roles of microRNAs and long-noncoding RNAs in human immunodeficiency virus replication. *Wiley Interdiscip Rev RNA* 6, 661-670.

Riou, C., Yassine-Diab, B., Van grevenynghe, J., Somogyi, R., Greller, L.D., Gagnon, D., Gimmig, S., Wilkinson, P., Shi, Y., Cameron, M.J., *et al.* (2007). Convergence of TCR and cytokine signaling leads to FOXO3a phosphorylation and drives the survival of CD4+ central memory T cells. *J Exp Med* 204, 79-91.

Routy, J.P., Tremblay, C.L., Angel, J.B., Trottier, B., Rouleau, D., Baril, J.G., Harris, M., Trottier, S., Singer, J., Chomont, N., *et al.* (2012). Valproic acid in association with highly active antiretroviral therapy for reducing systemic HIV-1 reservoirs: results from a multicentre randomized clinical study. *HIV Med* 13, 291-296.

Ruelas, D.S., Chan, J.K., Oh, E., Heidersbach, A.J., Hebbeler, A.M., Chavez, L., Verdin, E., Rape, M., and Greene, W.C. (2015). MicroRNA-155 Reinforces HIV Latency. *J Biol Chem* 290, 13736-13748.

Saez-Cirion, A., Bacchus, C., Hocqueloux, L., Avettand-Fenoel, V., Girault, I., Lecuroux, C., Potard, V., Versmisse, P., Melard, A., Prazuck, T., *et al.* (2013). Post-treatment HIV-1 controllers with a long-term virological remission after the interruption of early initiated antiretroviral therapy ANRS VISCONTI Study. *PLoS Pathog* 9, e1003211.

Sagot-Lerolle, N., Lamine, A., Chaix, M.L., Boufassa, F., Aboulker, J.P., Costagliola, D., Goujard, C., Pallier, C., Delfraissy, J.F., Lambotte, O., *et al.* (2008). Prolonged valproic acid treatment does not reduce the size of latent HIV reservoir. *AIDS* 22, 1125-1129.

Sallusto, F., Geginat, J., and Lanzavecchia, A. (2004). Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance. *Annu Rev Immunol* 22, 745-763.

Sallusto, F., Lenig, D., Forster, R., Lipp, M., and Lanzavecchia, A. (1999). Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature* 401, 708-712.

Siliciano, J.D., Kajdas, J., Finzi, D., Quinn, T.C., Chadwick, K., Margolick, J.B., Kovacs, C., Gange, S.J., and Siliciano, R.F. (2003). Long-term follow-up studies confirm the stability of the latent reservoir for HIV-1 in resting CD4+ T cells. *Nat Med* 9, 727-728.

Siliciano, J.D., Lai, J., Callender, M., Pitt, E., Zhang, H., Margolick, J.B., Gallant, J.E., Cofrancesco, J., Jr., Moore, R.D., Gange, S.J., *et al.* (2007). Stability of the latent reservoir for HIV-1 in patients receiving valproic acid. *J Infect Dis* 195, 833-836.

Sogaard, O.S., Graversen, M.E., Leth, S., Olesen, R., Brinkmann, C.R., Nissen, S.K., Kjaer, A.S., Schleimann, M.H., Denton, P.W., Hey-Cunningham, W.J., *et al.* (2015). The Depsipeptide Romidepsin Reverses HIV-1 Latency In Vivo. *PLoS Pathog* 11, e1005142.

Spina, C.A., Anderson, J., Archin, N.M., Bosque, A., Chan, J., Famiglietti, M., Greene, W.C., Kashuba, A., Lewin, S.R., Margolis, D.M., *et al.* (2013). An in-depth comparison of latent HIV-1 reactivation in multiple cell model systems and resting CD4+ T cells from aviremic patients. *PLoS Pathog* 9, e1003834.

Spivak, A.M., and Planelles, V. (2018). Novel Latency Reversal Agents for HIV-1 Cure. *Annu Rev Med* 69, 421-436.

Sung, T.L., and Rice, A.P. (2006). Effects of prostratin on Cyclin T1/P-TEFb function and the gene expression profile in primary resting CD4+ T cells. *Retrovirology* 3, 66.

Suraweera, A., O'Byrne, K.J., and Richard, D.J. (2018). Combination Therapy With Histone Deacetylase Inhibitors (HDACi) for the Treatment of Cancer: Achieving the Full Therapeutic Potential of HDACi. *Front Oncol* 8, 92.

Trejbalova, K., Kovarova, D., Blazkova, J., Machala, L., Jilich, D., Weber, J., Kucerova, D., Vencalek, O., Hirsch, I., and Hejnar, J. (2016). Development of 5' LTR DNA methylation of latent HIV-1 provirus in cell line models and in long-term-infected individuals. *Clin Epigenetics* 8, 19.

Tsai, P., Wu, G., Baker, C.E., Thayer, W.O., Spagnuolo, R.A., Sanchez, R., Barrett, S., Howell, B., Margolis, D., Hazuda, D.J., *et al.* (2016). In vivo analysis of the effect of panobinostat on cell-associated HIV RNA and DNA levels and latent HIV infection. *Retrovirology* 13, 36.

Tyagi, M., and Karn, J. (2007). CBF-1 promotes transcriptional silencing during the establishment of HIV-1 latency. *EMBO J* 26, 4985-4995.

Tyagi, M., Pearson, R.J., and Karn, J. (2010). Establishment of HIV latency in primary CD4+ cells is due to epigenetic transcriptional silencing and P-TEFb restriction. *J Virol* 84, 6425-6437.

Vandergeeten, C., Fromentin, R., Merlini, E., Lawani, M.B., DaFonseca, S., Bakeman, W., McNulty, A., Ramgopal, M., Michael, N., Kim, J.H., *et al.* (2014). Cross-clade ultrasensitive PCR-based assays to measure HIV persistence in large-cohort studies. *J Virol* 88, 12385-12396.

Wei, D.G., Chiang, V., Fyne, E., Balakrishnan, M., Barnes, T., Graupe, M., Hesselgesser, J., Irrinki, A., Murry, J.P., Stepan, G., *et al.* (2014). Histone deacetylase inhibitor romidepsin induces HIV expression in CD4 T cells from patients on suppressive antiretroviral therapy at concentrations achieved by clinical dosing. *PLoS Pathog* 10, e1004071.

Williams, S.A., Chen, L.F., Kwon, H., Fenard, D., Bisgrove, D., Verdin, E., and Greene, W.C. (2004). Prostratin antagonizes HIV latency by activating NF-kappaB. *J Biol Chem* 279, 42008-42017.

Williams, S.A., Chen, L.F., Kwon, H., Ruiz-Jarabo, C.M., Verdin, E., and Greene, W.C. (2006). NF-kappaB p50 promotes HIV latency through HDAC recruitment and repression of transcriptional initiation. *EMBO J* 25, 139-149.

Wong, J.K., Hezareh, M., Gunthard, H.F., Havlir, D.V., Ignacio, C.C., Spina, C.A., and Richman, D.D. (1997). Recovery of replication-competent HIV despite prolonged suppression of plasma viremia. *Science* 278, 1291-1295.

Xu, W.S., Parmigiani, R.B., and Marks, P.A. (2007). Histone deacetylase inhibitors: molecular mechanisms of action. *Oncogene* 26, 5541-5552.

Ylisastigui, L., Archin, N.M., Lehrman, G., Bosch, R.J., and Margolis, D.M. (2004). Coaxing HIV-1 from resting CD4 T cells: histone deacetylase inhibition allows latent viral expression. *AIDS* 18, 1101-1108.

Yukl, S.A., Kaiser, P., Kim, P., Telwatte, S., Joshi, S.K., Vu, M., Lampiris, H., and Wong, J.K. (2018). HIV latency in isolated patient CD4(+) T cells may be due to blocks in HIV transcriptional elongation, completion, and splicing. *Sci Transl Med* 10.

Figure 1

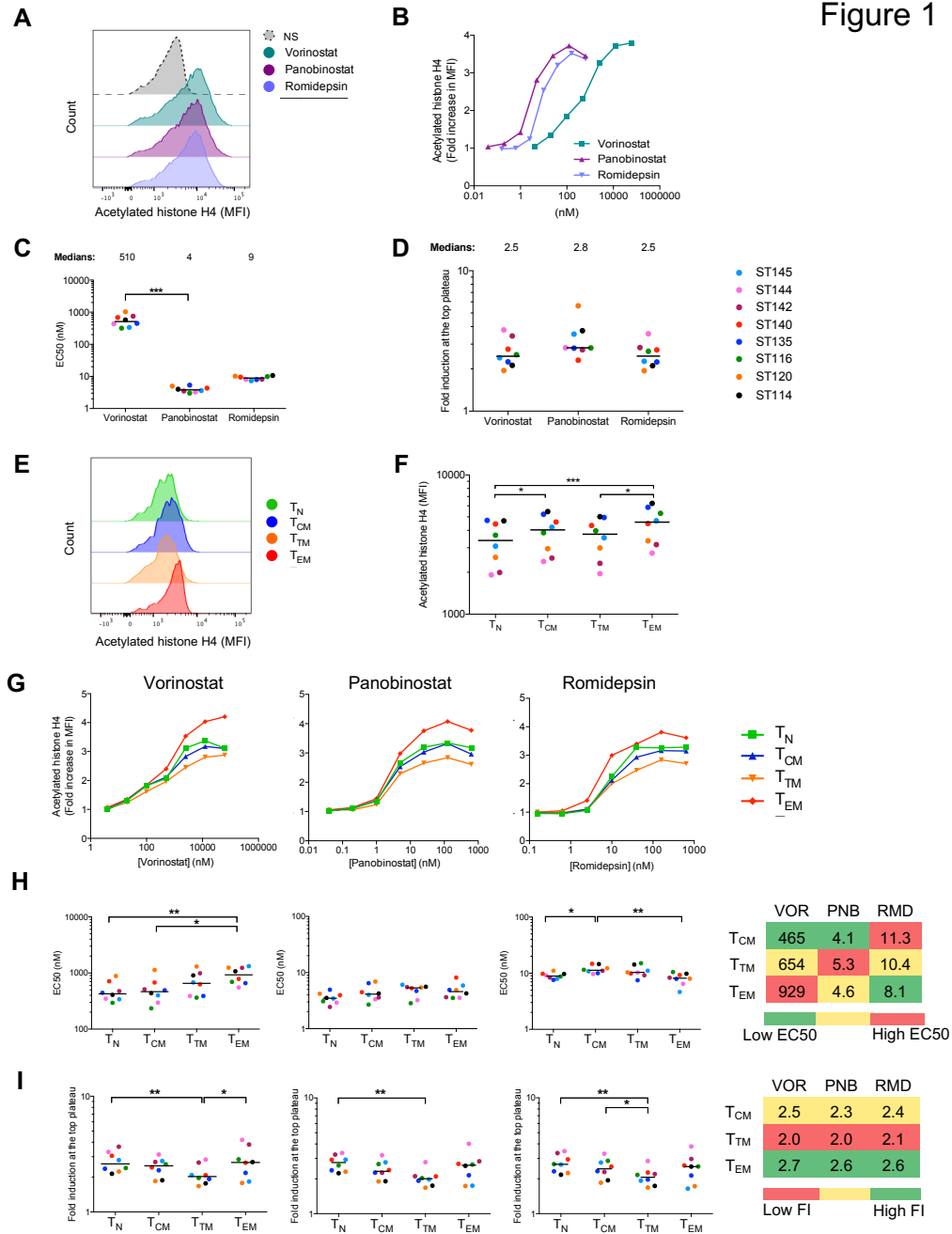


Figure 1. HDAC inhibitors display variable activities in subsets of memory CD4 T cells. Levels of acetylated histone H4 were determined by intracellular flow cytometry in CD4 T cells (A-D) and gated memory subsets (E-I) from n=8 ART-suppressed individuals. (A) Representative histograms showing the expression of acetylated histone H4 in response to the indicated HDACi (maximal dose, see materials and methods) compared to the non-stimulated condition (NS). (B) Dose-response curves of acetylated histone H4 in response to the 3 HDACi indicated. (C) EC50 and (D) fold induction at the top plateau in total CD4 T cells were determined from the dose-response curves. (E) Representative histograms from one participant showing the expression of acetylated histone in the absence of stimulation in gated CD4 T cell subsets and (F) expression levels in subsets from 8 participants. (G) Representative dose-response curves of acetylated histone H4 in gated CD4 subsets following exposure to the 3 HDACi indicated. (H) EC50 and (I) fold induction at the top plateau in CD4 subsets were determined from the dose-response curves. Tables on the right indicate the subsets in which each drug exerts maximal potency (low EC50, in green) and maximal efficacy (high fold induction, in green). VOR: vorinostat; PNB: panobinostat, RMD: romidepsin. Horizontal bars represent median values. For statistical analyses, Friedman tests with Dunn's correction for multiple comparisons were used (*adjusted p value <0.05; **<0.01; ***<0.001). See also Figures S1, S2, and Table S1.

Figure 2

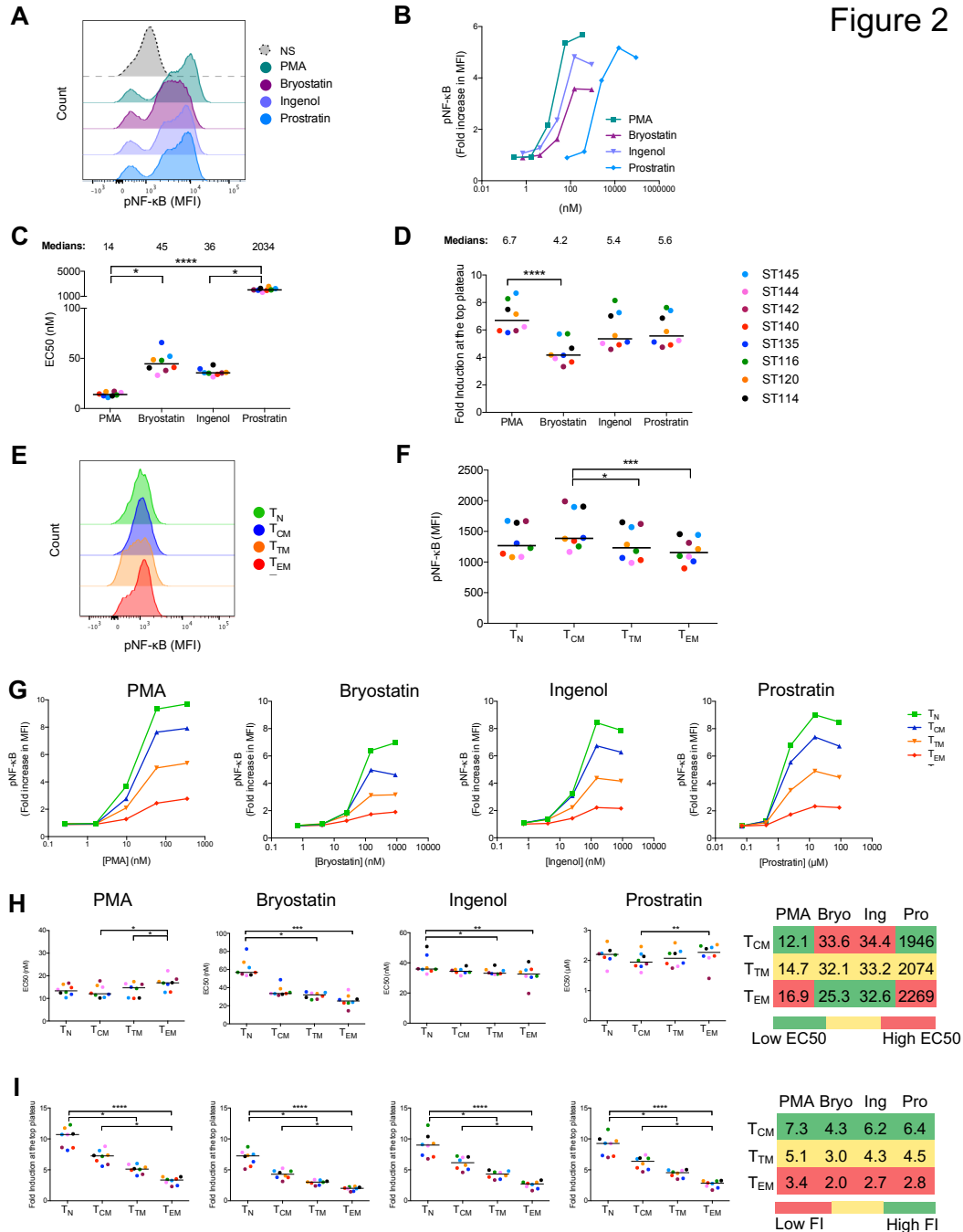


Figure 2. PKC agonists display variable activities in subsets of memory CD4 T cells. Levels of pNF-κB were determined by intracellular flow cytometry in CD8-CD3+ T cells (A-D) and gated memory subsets (E-I) from n=8 ART-suppressed individuals. (A) Representative histograms showing the expression of pNF-κB in response to the indicated agonists of PKC (maximal dose, see materials and methods) compared to the non-stimulated condition (NS). (B) Dose-response curves of pNF-κB in response to the 4 PKC agonists indicated. (C) EC50 and (D) fold induction at the top plateau in total CD4 T cells were determined from the dose-response curves. (E) Representative histograms from one participant showing the expression of pNF-κB in the absence of stimulation in gated CD4 subsets and (F) expression levels in subsets from 8 participants. (G) Representative dose-response curves of pNF-κB in gated CD4 subsets following exposure to the 4 PKC agonists indicated. (H) EC50 and (I) fold induction at the top plateau in CD4 subsets were determined from the dose-response curves. The tables on the right indicate the subsets in which each drug exerts maximal potency (low EC50, in green) and maximal efficacy (high fold induction, in green). Bryo: bryostatins, Ing: ingenol, Pro: prostratin. Horizontal bars represent median values. For statistical analyses, Friedman tests with Dunn's correction for multiple comparisons were used (*adjusted p value <0.05; ** <0.01; *** <0.001). See also Table S1.

Figure 3

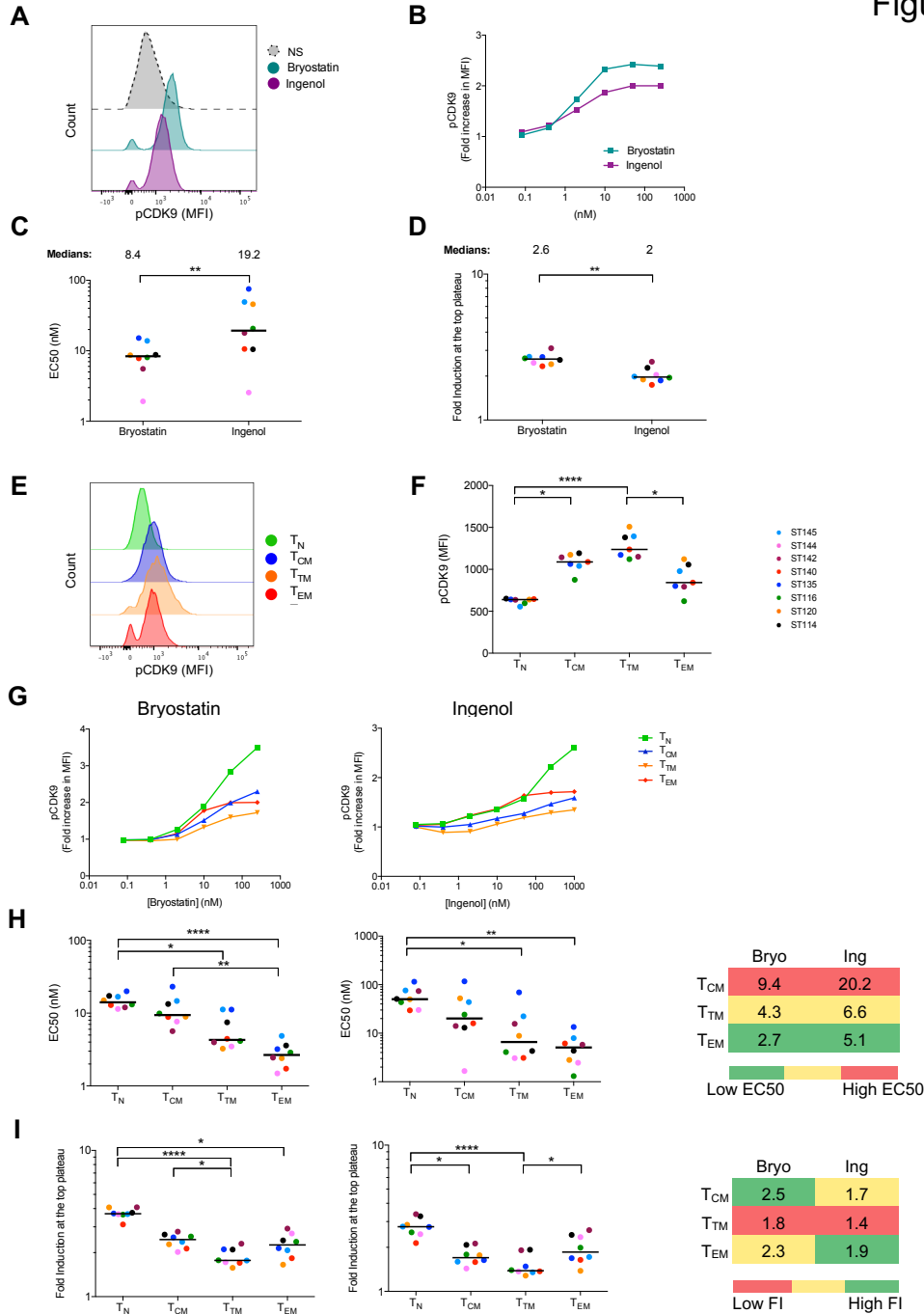


Figure 3. PKC agonists are more potent at activating P-TEFb in differentiated subsets. Levels of pCDK9 (pS175) were determined by intracellular flow cytometry in CD4 T cells (A-D) and gated memory subsets (E-I) from n=8 ART-suppressed individuals. (A) Representative histograms showing the expression of pCDK9 in response to the indicated agonists of PKC (maximal dose, see materials and methods) compared to the non-stimulated condition (NS). (B) Dose-response curves of pCDK9 in response to the 2 PKC agonists indicated. (C) EC50 and (D) fold induction at the top plateau in total CD4 T cells were determined from the dose-response curves. (E) Representative histograms from one participant showing the expression of pCDK9 in the absence of stimulation in gated CD4 subsets and (F) expression levels in subsets from 8 participants. (G) Representative dose-response curves of pCDK9 in response to the 2 PKC agonists indicated in gated CD4 subsets. (H) EC50 and (I) fold induction at the top plateau in CD4 subsets were determined from the dose-response curves. The tables on the right indicate the subsets in which each drug exerts maximal potency (low EC50, in green) and maximal efficacy (high fold induction, in green). Bryo: bryostatin, Ing: ingenol. Horizontal bars represent median values. For statistical analyses, Friedman tests with Dunn's correction for multiple comparisons were used (*adjusted p value <0.05; ** <0.01; ***<0.001). See also Table S1.

Figure 4

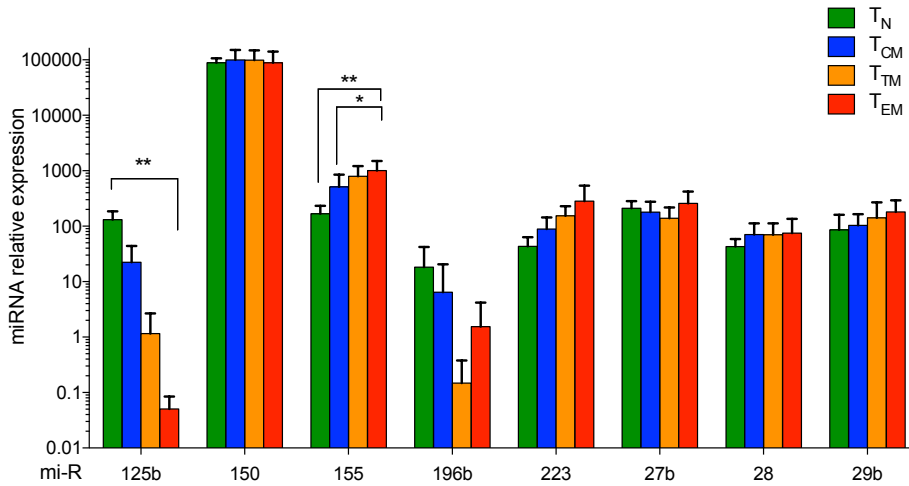


Figure 4. miR125b and miR155 are expressed at different levels in distinct memory subsets. The indicated miRNAs were quantified by RT-qPCR in subsets of CD4 T cells obtained by flow cytometry cell sorting from n=5 virally suppressed individuals. Levels of expression of each miRNA were normalized to the levels of GAPDH reference gene. Means and standard deviations are represented. For each miRNA, Friedman tests with Dunn's correction for multiple comparisons were used (*adjusted p value <0.05; ** <0.01). See also Table S2.

Figure 5

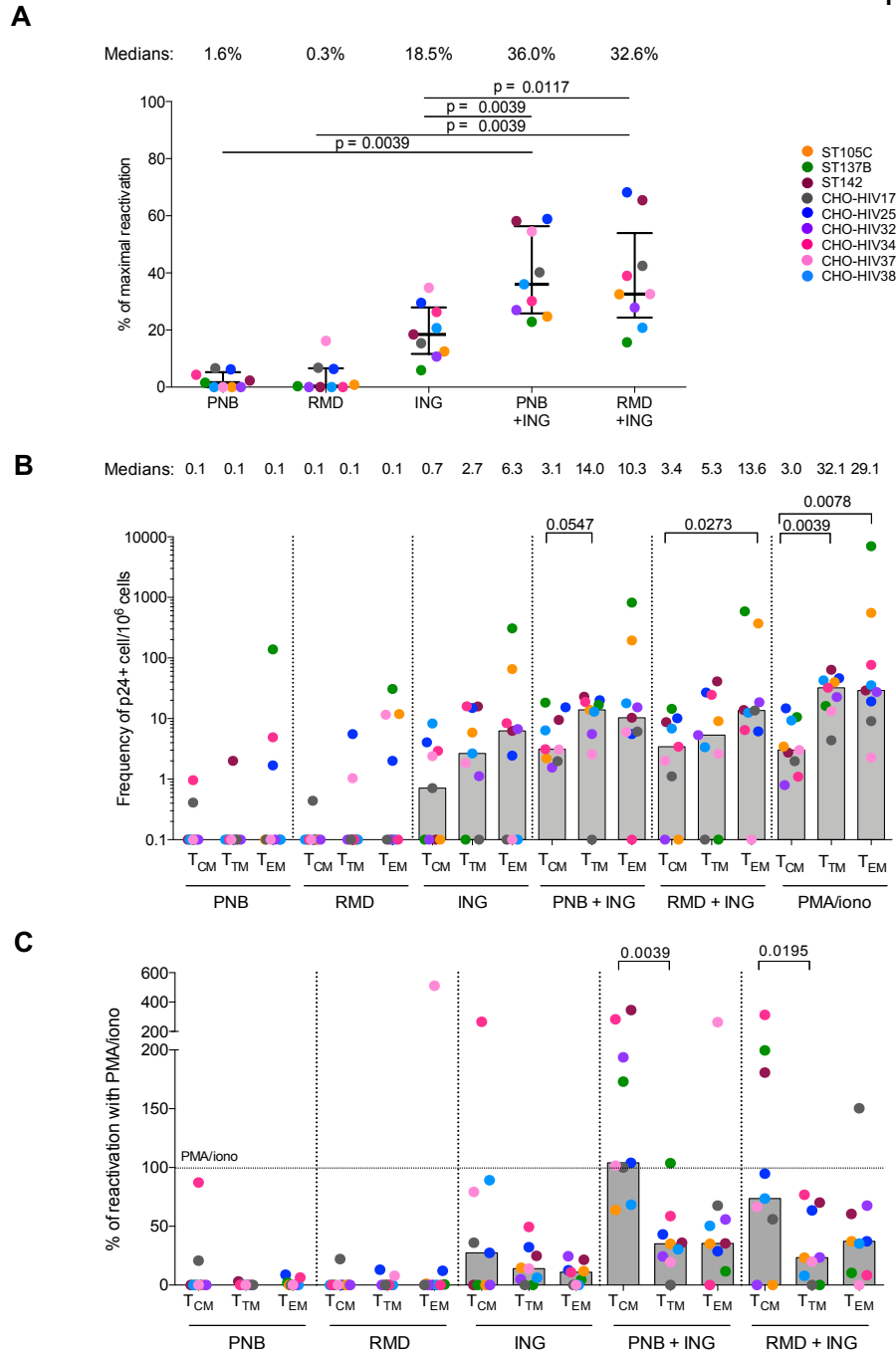


Figure 5. PKC agonists in combination with HDACi have enhanced capacity to reactivate HIV in T_{CM} cells. HIV-Flow was used to measure the frequency and characterize the phenotype of p24+ cells upon reactivation of latent proviruses. CD4 T cells isolated from n=9 ART-suppressed individuals were exposed to LRAs (PNB: 100nM panobinostat, RMD: 100nM romidepsin, ING: 500nM ingenol). (A) Relative percentage of maximal reactivation obtained with PMA/ionomycin (100%). Medians and interquartile ranges are shown. (B) Frequency of p24+ cells per million T_{CM} , T_{TM} , T_{EM} cells. Grey columns depict median values. (C) Percentage of maximal reactivation obtained with PMA/ionomycin in each subset of memory CD4 T cells. The level of reactivation obtained with PMA/ionomycin (100%) is represented by a dotted horizontal line. Grey columns depict median values. For statistical analyses, non-parametric Wilcoxon tests were used; statistically significant p values are indicated on the graphs. See also Figures S3, S4 and Table S1.

Table 1. Characteristics of study participants

ID	Age (years)	Gender ^a	CD4 (cells/ μ L)	CD8 (cells/ μ L)	CD4/CD8 Ratio	Viral Load (HIV RNA copies/mL)	Time to ART initiation (years)	Estimated time of infection (years) ^b	Time on ART (years)
ST114	40	M	1145	1410	0.8	< 20	0.4	6.2	5.9
ST116	47	M	772	921	0.8	< 20	2.6	9.4	6.8
ST120	48	M	686	792	0.9	< 20	6.0	15.4	9.4
ST135	32	M	734	703	1.0	< 20	4.9	7.4	2.5
ST140	36	M	1102	875	1.3	< 20	N.A ^c	N.A	N.A
ST142	46	F	1030	1192	0.9	< 20	N.A	18.6	N.A
ST144	56	M	715	709	1.0	140	N.A	27.6	N.A
ST145	46	M	1897	830	2.3	< 20	N.A	19.7	N.A
ST105C	60	M	677	788	0.9	< 20	N.A	N.A	N.A
ST137B	41	M	267	518	0.5	< 20	N.A	N.A	N.A
CHO-17	48	M	662	658	1.0	< 40	0.2	16.9	16.7
CHO-18	36	M	882	1177	0.7	< 40	4.7	13.8	9.1
CHO-20	55	M	847	613	1.4	< 40	15.1	29.3	14.1
CHO-25	60	M	803	422	1.9	< 40	4.8	25.1	20.4
CHO-32	47	M	625	511	1.2	< 40	0.3	15.1	14.8
CHO-34	36	M	471	322	1.5	< 40	7.8	12.0	4.2
CHO-37	58	M	602	349	1.7	< 20	1.0	9.2	7.9
CHO-38	57	M	1173	1209	1.0	< 20	0.6	20.7	20.1
<i>Median</i>	47	-	753	749	1.0	-	3.7	15.4	9.3
<i>IQ range</i>	[40-56]	-	[666-993]	[542-910]	[0.9-1.4]	-	[0.5-5.2]	[10.7-20.2]	[6.5-15.3]

^aF = female, M = male

^bTime of infection was calculated from the date of diagnosis

^cN.A = not available

Figure S1

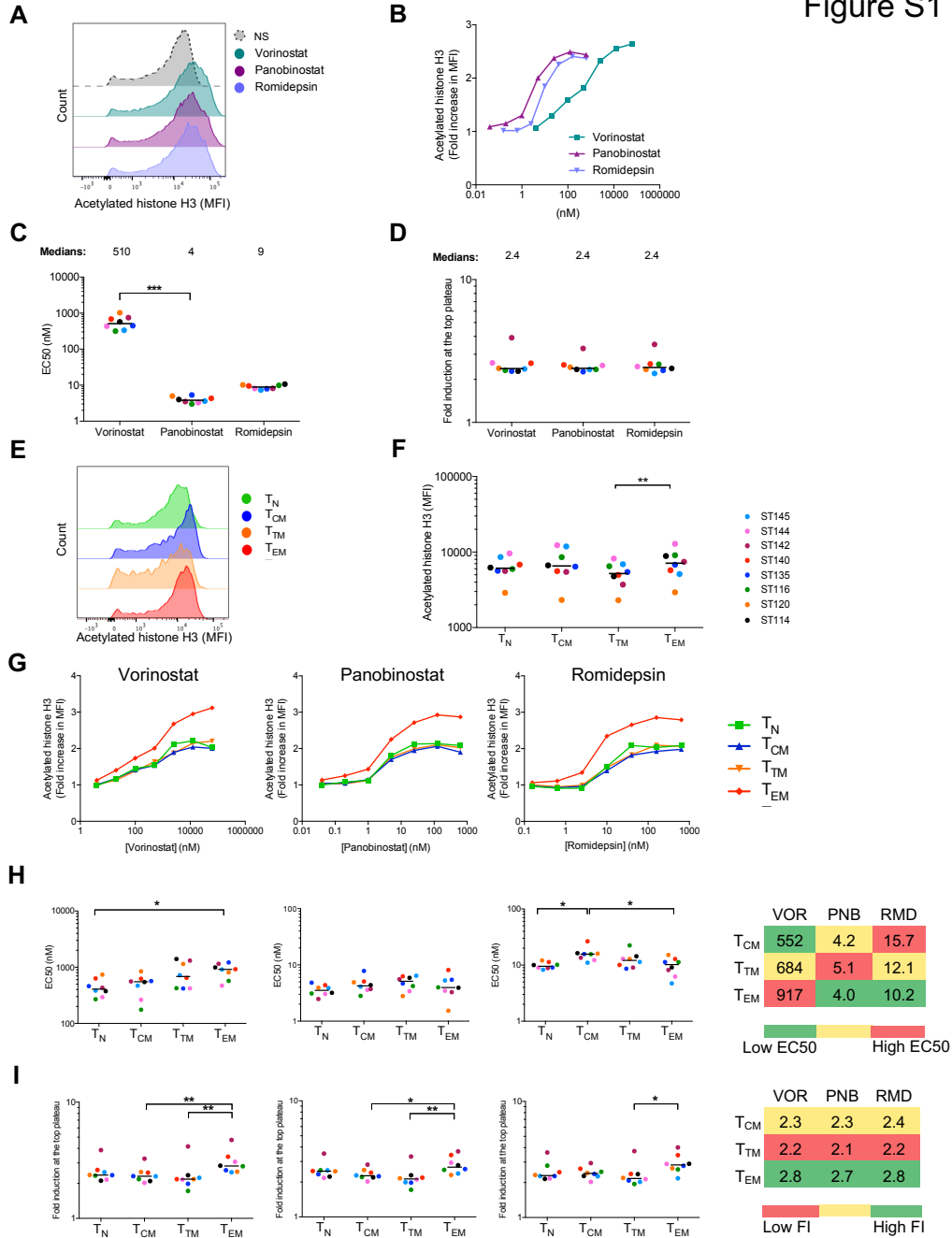


Figure S1. Related to Figure 1. HDAC inhibitors display variable activities in subsets of memory CD4 T cells. Levels of acetylated histone H3 were determined by intracellular flow cytometry in CD4 T cells (A-D) and gated memory subsets (E-I) from n=8 ART-suppressed individuals. (A) Representative histograms showing the expression of acetylated histone H3 in response to the indicated HDACi (maximal dose, see materials and methods) compared to the non-stimulated condition (NS). (B) Dose-response curves of acetylated histone H3 in response to the 3 HDACi indicated. (C) EC50 and (D) fold induction at the top plateau in total CD4 T cells were determined from the dose-response curves. (E) Representative histograms from one participant showing the expression of acetylated histone H3 in the absence of stimulation in gated CD4 T cell subsets and (F) expression levels in subsets from 8 participants. (G) Representative dose-response curves of acetylated histone H3 in gated CD4 subsets following exposure to the 3 HDACi indicated. (H) EC50 and (I) fold induction at the top plateau in CD4 subsets were determined from the dose-response curves. Tables on the right indicate the subsets in which each drug exerts maximal potency (low EC50, in green) and maximal efficacy (high fold induction, in green). VOR: vorinostat; PNB: panobinostat, RMD: romidepsin. Horizontal bars represent median values. For statistical analyses, Friedman tests with Dunn's correction for multiple comparisons were used (*adjusted p value <0.05; ** <0.01; *** <0.001).

Figure S2

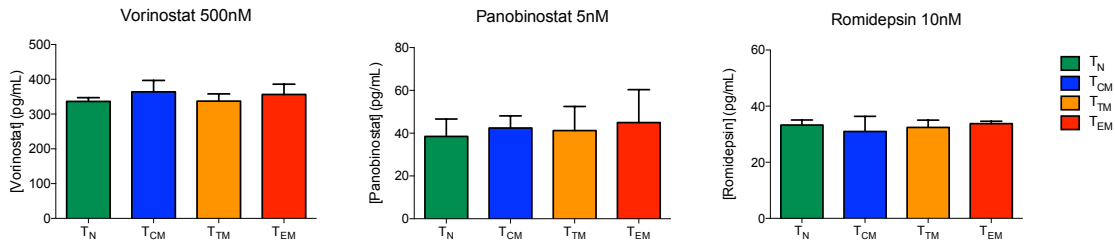


Figure S2. Related to Figure 1. HDACi uptake is not significantly different between subsets of memory CD4 T cells. Sorted subsets of CD4 T cells from n=2 ART-suppressed individuals were exposed for 4h to vorinostat (500nM), panobinostat (5nM) and romidepsin (10nM). Intracellular concentrations of HDACi were determined by LC-MS/MS analysis. Medians with interquartile ranges are represented.

Figure S3

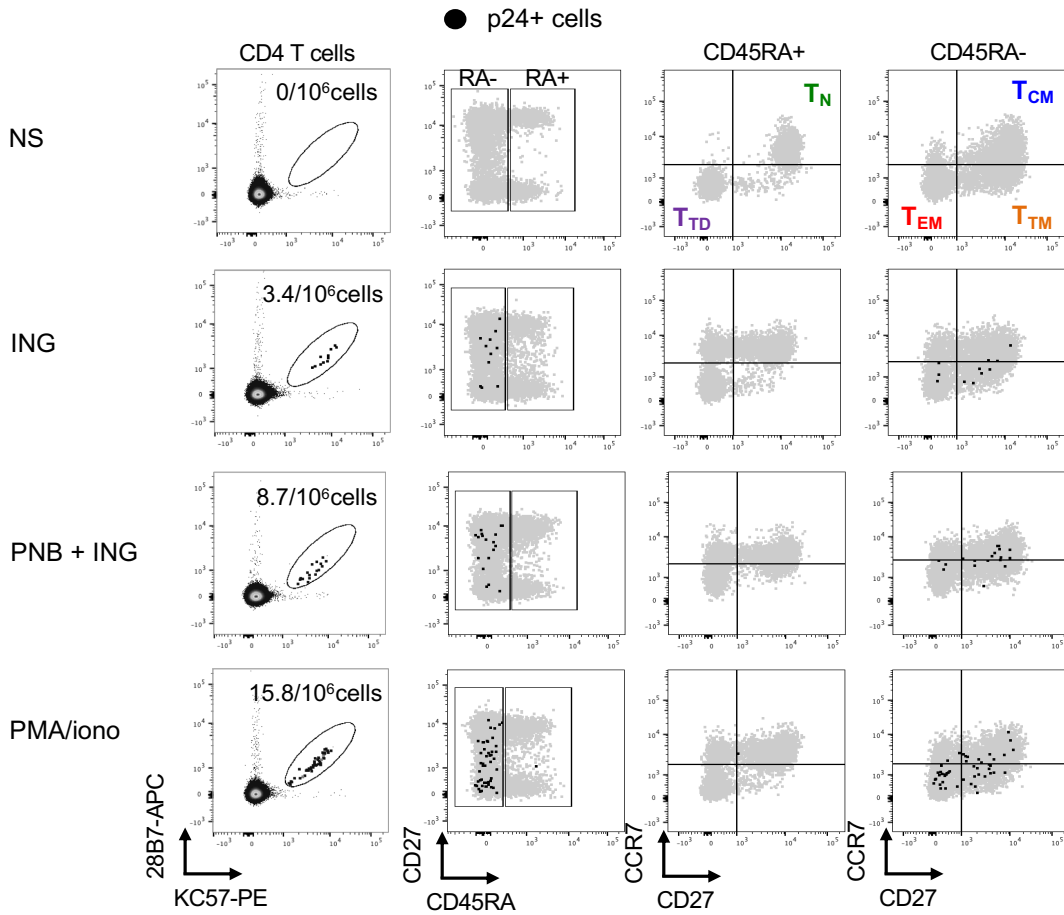


Figure S3. Related to Figure 5. Memory phenotype of CD4 T cells after stimulation with LRAs. Representative dot plots showing the co-staining p24 KC57/p24-28B7 and the memory phenotype of p24+ cells (represented as black dots) overlaid onto all cells (in grey), after a 24h-stimulation with high doses of LRAs alone or in combination. PNB: 100nM panobinostat, ING: 500nM ingenol.

Figure S4

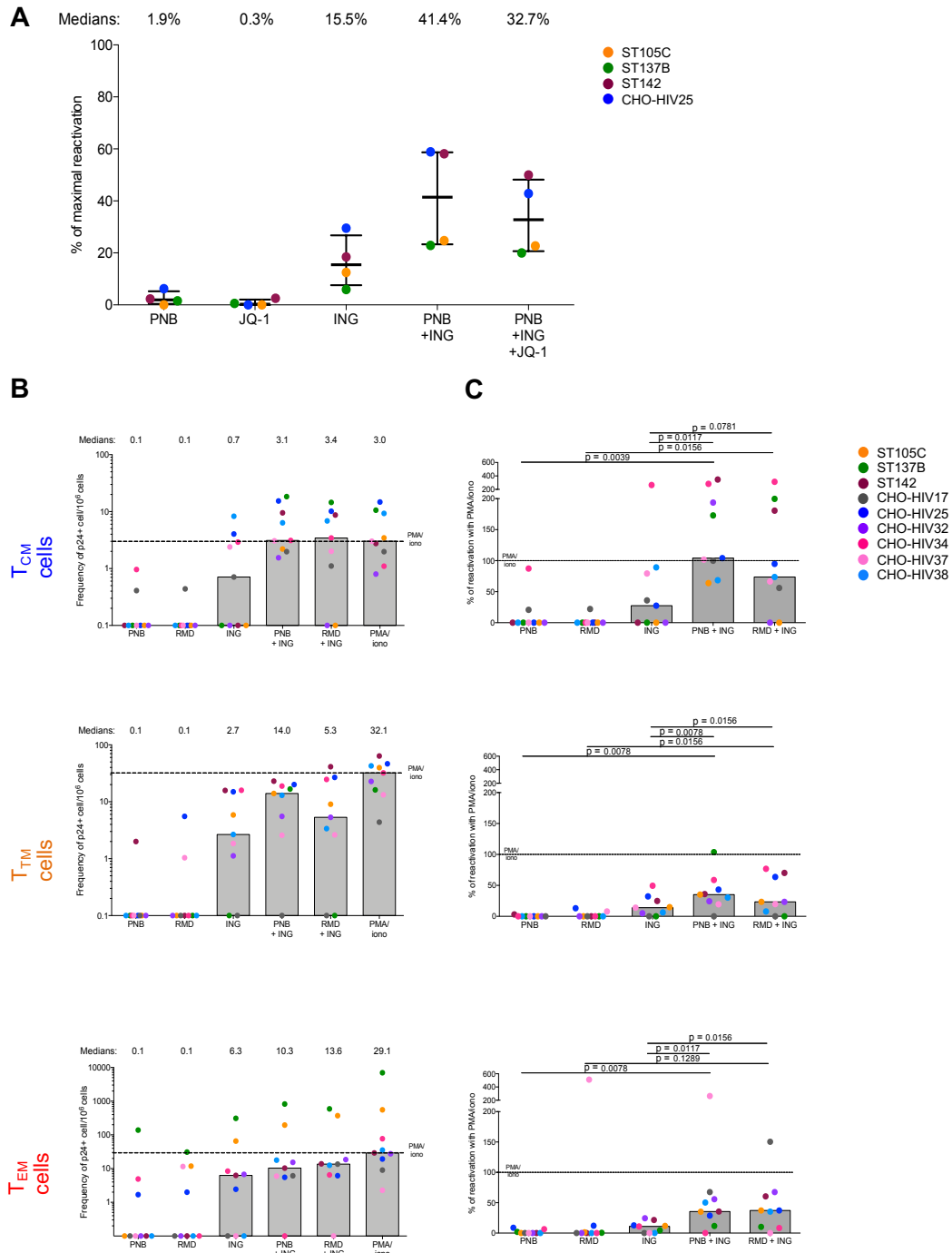


Figure S4. Related to Figure 5. PKC agonists in combination with HDACi have enhanced capacity to reactivate HIV in T_{CM} cells. HIV-Flow was used to measure the frequency and characterize the phenotype of p24+ cells upon reactivation of latent proviruses. CD4 T cells isolated from n=9 ART-suppressed individuals were exposed to LRAs (PNB: 100nM panobinostat, JQ-1: 10 μ M, ING: 500nM ingenol). (A) Relative percentage of maximal reactivation obtained with PMA/ionomycin (100%). Medians and interquartile ranges are shown. (B) Frequency of p24+ cells per million T_{CM} , T_{TM} , T_{EM} cells. Grey columns depict median values. (C) Percentage of maximal reactivation obtained with PMA/ionomycin in each subset of memory CD4 T cells. The level of reactivation obtained with PMA/ionomycin (100%) is represented by a dotted horizontal line. Grey columns depict median values. For statistical analyses, non-parametric Wilcoxon tests were used.

Table S1

Supplementary Table 1: Antibodies to cell surface markers

Panel	Cell surface marker	Antibody clone	Fluorochrome	Company	Catalog number
Histone acetylation (H3K9, H4K5/8/12/16)	CD3	UCHT1	A700	BD Bioscience	557943
	CD4	S3.5	Qdot605	Life Technologies	Q10008
	CD8	RPA-T8	PerCPy5.5	BD Bioscience	560662
	CD45RA	HI100	BUV737	BD Bioscience	564442
	CD27	O323	BV650	Biologend	302828
	CCR7	3D12	PeCy7	BD Bioscience	557648
Activated NF-κB (pS529 p65)	CD3	UCHT1	A700	BD Bioscience	557943
	CD4	S3.5	Qdot605	Life Technologies	Q10008
	CD8	RPA-T8	PB	BD Bioscience	558207
	CD45RA	HI100	BV786	BD Bioscience	563870
	CD27	L128	BV650	BD Bioscience	563228
	CCR7	150503	AF647	BD Bioscience	560816
Activated P-TEFb (pS175 CDK9)	CD3	UCHT1	BUV496	BD Bioscience	564809
	CD4	S3.5	Qdot605	Life Technologies	Q10008
	CD8	RPA-T8	PB	BD Bioscience	558207
	CD45RA	HI100	BUV737	BD Bioscience	564442
	CD27	O323	BV650	Biologend	302828
	CCR7	3D12	PeCy7	BD Bioscience	557648
HIV-infected cells (p24-dual staining)	CD3	UCHT1	A700	BD Bioscience	557943
	CD4	SK3	BUV496	BD Bioscience	564651
	CD8	RPA-T8	BUV395	BD Bioscience	563795
	CD45RA	HI100	BV786	BD Bioscience	563870
	CD27	O323	BV421	Biologend	302823
	CCR7	3D12	BB700	BD Bioscience	566437

Table S2

Supplementary Table 2: Sequences of the oligonucleotides used to quantify miRNA by real time PCR

	3p/5p	Forward primer	Reverse primer
GAPDH	Control	GCCATCAATGACCCCTTCAT	TTGACGGTGCCATGGAATTT
miR-125b	5p	GCAGTCCCTGAGACCCTAACTT	GGTCCAGTTTTTTTTTTTTTTTTCAC
miR-150	5p	GCAGTCTCCCAACCCTTGTA	GGTCCAGTTTTTTTTTTTTTTTCACT
miR-155	5p	TCGCAGTTAATGCTAATCGTGA	CCAGTTTTTTTTTTTTTTTACCCTA
miR-196b	5p	CGCAGTAGGTAGTTTCCTGTTGT	CCAGTTTTTTTTTTTTTTTCCCA
mi-R223	3p	CGCAGTGTCAGTTTGCAAATAC	CCAGTTTTTTTTTTTTTTTGGG
miR-27b	3p	CGCAGTTCACAGTGGCTAAGTT	GTCCAGTTTTTTTTTTTTTTTGCAG
miR-28	5p	CGCAGAAGGAGCTCACAGTCTAT	GGTCCAGTTTTTTTTTTTTTTTCTCA
miR-29b	3p	GCAGTAGCACCATTTGAAATCA	GGTCCAGTTTTTTTTTTTTTTTAACAC

Chapitre 4 : La majorité des cellules T CD4 infectées par le VIH dans les ganglions lymphatiques des individus sous ART produisent spontanément des ARN viraux.

Contexte et hypothèse : Les ganglions lymphatiques présentent un microenvironnement privilégié pour la réplication du VIH et sa persistance à long-terme. De plus, les cellules Tfh sont un site majoritaire de persistance virale chez les individus sous ART. Plusieurs études ont montré l'existence d'une transcription résiduelle continue dans ce compartiment anatomique à la fois chez les individus VIH+ et chez des macaques SIV+. Néanmoins, aucune étude n'a étudié la contribution de la latence à la persistance du virus dans ce tissu. Par ailleurs, des études complémentaires sont nécessaires pour déterminer si les cellules infectées transcriptionnellement actives sont également capables de produire des protéines virales et des virions infectieux compétents pour la réplication dans le contexte de la thérapie antirétrovirale. Enfin, les cellules Tfh PD-1+ des ganglions lymphatiques sont hautement permissives à l'infection par le VIH et sont enrichies en ARN associé aux cellules et en virus compétents pour la réplication chez les individus traités pour une médiane de temps de 5 ans. Néanmoins, la contribution de ces cellules à la persistance virale chez des individus sous thérapie antirétrovirale depuis une plus longue période de temps n'est pas connue.

Objectifs : Cette étude comporte trois objectifs principaux :

- Caractériser les contributions de la latence et de la transcription résiduelle spontanée dans les ganglions lymphatiques et le sang périphérique d'individus infectés par le VIH sous ART.
- Étudier la capacité des cellules infectées à produire spontanément des protéines p24 dans les ganglions lymphatiques d'individus sous ART.
- Étudier la contribution des cellules PD-1+ et PD-1- au pool de cellules infectées dans les ganglions lymphatiques d'individus traités pour une longue période de temps (>8 ans).

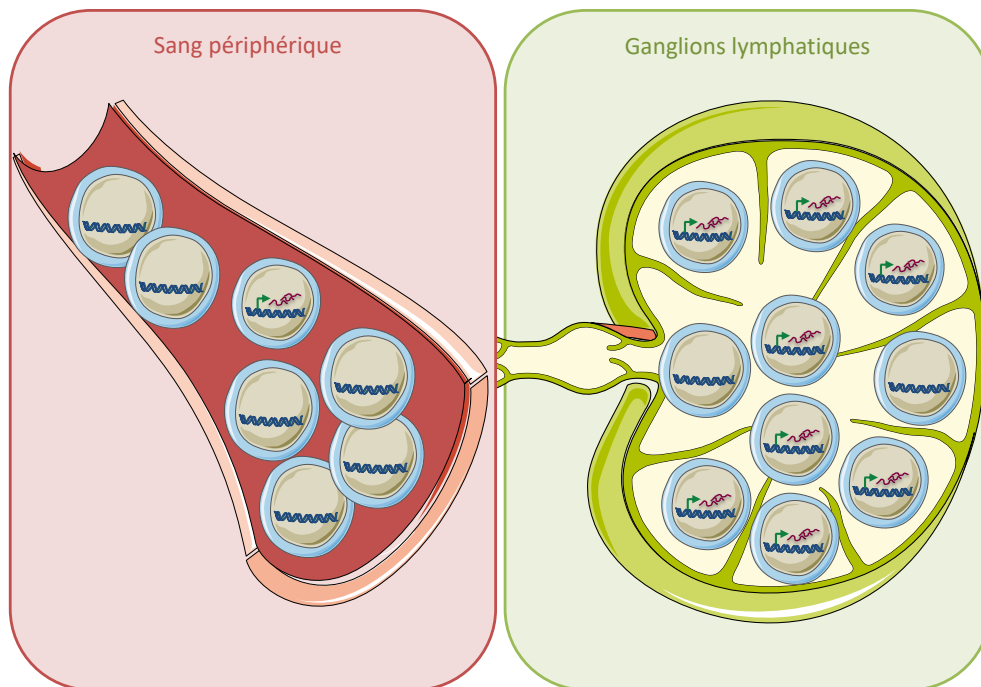
Statut de l'article : Cet article est en cours d'écriture et sera soumis au cours des deux prochains mois. La version présentée dans cette thèse ne constitue pas la version finale. Des échantillons supplémentaires (FNA et biopsies) seront encore reçus et les nouvelles analyses et résultats seront inclus à cet article.

Contribution détaillée de chacun des auteurs :

Ma contribution personnelle à cet article est de 80%. J'ai réalisé la majorité des expériences présentées dans cet article, et j'ai effectué toutes les analyses de données ainsi que la présentation des figures. Rémi Fromentin a développé les méthodes pour traiter les échantillons

de ganglions lymphatiques, a participé au développement des expériences et a été présent tout au long de cette étude pour apporter ses conseils et m'aiguiller. Amélie Pagliuzza et Louise Leyre ont effectué les mesures d'ADN intégré. Poonam Vohra, Dianna Ng, Viva Tai, Rebecca Hoh, Marian Kerbleski, Frederick Hecht, Steven Deeks, Jeffrey Milush et Peter Hunt ont participé aux prélèvements des biopsies et FNA ainsi qu'au recrutement et à la collecte des données cliniques des participants. Nicolas Chomont a supervisé chaque étape de cette étude et a édité le manuscrit avec la contribution de chacun des co-auteurs.

Résumé graphique



Points importants à retenir:

- Dans les ganglions lymphatiques d'individus sous ART, la majorité des cellules CD4 infectées sont transcriptionnellement actives.
- Une production virale active n'a pas pu être observée par HIV-Flow dans les ganglions lymphatiques d'individus sous ART, probablement suite au faible nombre de cellules CD4 analysées.
- La fréquence de Tfh diminue avec le temps sous traitement.
- Chez les individus sous ART pour une période de temps prolongée (médiane de 12 ans), les cellules PD-1^{neg} contribuent majoritairement à la persistance virale.
- Dans les ganglions lymphatiques, la fréquence de cellules infectées semble diminuer avec le temps sous traitement, suggérant que le réservoir est moins stable dans ce compartiment anatomique que dans le sang.

The majority of persistently infected CD4+ T cells are transcriptionally active in lymph nodes from HIV-infected individuals on antiretroviral therapy

Marion Pardons¹, Rémi Fromentin¹, Louise Leyre¹, Amélie Pagliuzza¹, Poonam Vohra², Dianna Ng², Rebecca Hoh², Marian Kerbleski², Viva Tai², Jeffrey Milush², Frederick Hecht², Steven Deeks², Peter Hunt², Nicolas Chomont^{1*}

¹Centre de Recherche du CHUM and Department of Microbiology, Infectiology and Immunology, Université de Montréal, Canada

²Department of Medicine, University of California, San Francisco, California, United States

* Corresponding author:

Nicolas Chomont

Université de Montréal, Centre de Recherche du CHUM, 900 rue St-Denis, H2X0A9, QC, Canada

Tel: +1 514-890-8000 #31266

E-mail: nicolas.chomont@umontreal.ca

Keywords: HIV persistence, lymph nodes, Tfh cells, latency, residual production

Abstract

Lymph nodes are major sites for HIV persistence in people receiving antiretroviral therapy (ART), with T follicular helper (Tfh) cells representing a preferential viral reservoir within this tissue. Although it is well established that HIV mainly persists as a latent provirus in circulating CD4+ T cells from ART-suppressed individuals, little is known about the transcriptional status of these cells in lymph nodes. Using matched blood and lymph nodes CD4+ T cells from virally suppressed individuals, we observed that the majority of circulating cells were transcriptionally inactive, while most infected cells in lymph nodes spontaneously produced tat/rev RNA. In a cross-sectional analysis, the frequency of germinal center Tfh cells decreased with time on ART ($p=0.006$, $r=-0.52$). After prolonged therapy (median duration of ART = 12 years), PD-1 expressing cells minimally contributed to the pool of persistently infected cells in lymph nodes. Whereas the size of the inducible reservoir remained stable over time in the blood, we observed a trend for a decay in the pool of infected cells in lymph node with the duration of viral suppression. Altogether, these results indicate that most persistently infected cells in lymph nodes are transcriptionally active and suggest that the pool of infected cells may decay more rapidly in this compartment compared to blood.

Introduction

HIV persistence in ART-suppressed individuals [1-3] is responsible for HIV rebound post ART cessation in all but exceptional cases [4]. HIV persists in various anatomic sanctuaries including lymph nodes, gut-associated lymphoid tissue, spleen, liver, tonsils, genital tracts, and the central nervous system [5]. Several studies have identified lymph node B cell follicles as immunoprivileged sanctuaries for HIV/SIV replication and persistence [6-13]. This can be explained by several factors including 1) lower frequencies of cytotoxic T lymphocytes (CTL) within the B cell follicles compared to the extrafollicular region [14, 15] together with a possible alteration of functions (exhaustion characterized by high PD-1 expression, lower cytolytic activity and reduced polyfunctionality) [16, 17], 2) the accumulation of infectious virions at the surface of follicular dendritic cells [18, 19], and 3) the HIV-associated expansion of follicular regulatory CD4 (CD4 Tfr) [20] and CD8 (CD8 Tfr) [21] T cells that inhibit antibody production [22, 23].

In B cell follicles, the majority of CD4 T cells has a follicular helper T cell (Tfh) phenotype. Tfh cells play an important role in helping B cells for their maturation, class switching, and antibody production [24] and are characterized by the expression of the master transcription factor Bcl-6, as well as cell surface expression of CXCR5, PD-1, and ICOS [24]. Tfh cells can be classified into two cell subsets: germinal center (GC)-localized Tfh cells which are characterized by high levels of PD-1 and CXCR5 expression, and a non-GC subset defined by intermediate levels of PD-1 and CXCR5 [25]. In *ex vivo* cultures, Tfh cells are more susceptible to HIV infection than extrafollicular CD4 T cells, with GC-localized Tfh cells being more permissive than non-GC Tfh cells [26]. Follicular helper T cells (Tfh) from lymph nodes are major reservoirs for HIV replication and persistence: in untreated macaques [27] and humans [12], Tfh cells from lymph nodes are enriched in proviral DNA compared to non-Tfh cells. During ART, PD-1+ Tfh cells contain higher levels of cell associated RNA and are the major source of replication competent viruses when compared to any other subset defined by the expression of CXCR5 and PD-1 [13].

Although short and abortive viral transcripts are produced by a large fraction of infected CD4+ T cells in the peripheral blood of ART-suppressed individuals [28], most infected cells do not produce spliced transcripts nor viral proteins [29, 30]. In lymph nodes, infected cells producing HIV/SIV RNA persist during ART, suggesting the existence of residual transcription in this compartment [10, 13, 31, 32]. Whether the production of viral RNA results in the production of infectious viruses responsible for new cycles of replication and replenishment of the reservoir remains controversial [33, 34].

No study has assessed the relative contributions of latency and residual transcription to viral persistence in lymph nodes from ART-suppressed individuals. To address this question, we used matched blood and lymph node cells from virally suppressed individuals and measured the frequencies of latently and transcriptionally active infected cells in both compartments.

Results

The majority of persistently infected CD4 T cells spontaneously produce multiply spliced RNA in lymph nodes from virally suppressed individuals.

We sought to determine the relative proportion of cells actively transcribing HIV genes in the blood and lymph nodes from virally suppressed individuals. As expected in ART-suppressed individuals [29], most infected CD4 T cells from the peripheral blood were transcriptionally inactive. Indeed, the frequency of cells expressing *tat/rev* RNA significantly increased following stimulation with PMA/ionomycin compared to the *ex vivo* condition ($p = 0.003$; median fold change = 3.5X, Fig. 1A, Fig S1A). CD4 T cells producing multiply spliced RNA spontaneously were detected at a higher frequency in lymph nodes than in matched blood samples ($p=0.02$, Fig. 1A, Fig S1A). Moreover, when cells were stimulated with PMA/ionomycin, the frequency of CD4 T cells producing *tat/rev* RNA was not further increased ($p=0.58$, median fold change = 1.4X, Fig. 1A and Fig. S1A). These observations suggest that most infected cells are transcriptionally active in lymph nodes and that latently infected cells are rare in lymph nodes from virally suppressed individuals. Of note, levels of integrated HIV DNA were higher in lymph nodes compared to blood samples ($p=0.008$; Fig. S1B), consistent with the immunoprivileged environment for viral persistence in this tissue. The frequencies of cells producing *tat/rev* RNA spontaneously in the blood and in the lymph nodes were not significantly associated ($p=0.15$, $r=0.53$, Fig. 1B). In contrast, the frequency of cells producing *tat/rev* RNA after stimulation (total reservoirs) was positively associated between blood and lymph nodes ($p=0.03$, $r=0.66$, Fig. 1C). These observations suggest that the transcriptional status of infected cells depends on their location.

Since most CD4 T cells were transcriptionally active in lymph nodes from ART-suppressed individuals, we used the recently developed HIV-Flow assay [36] to determine if these cells also produced viral proteins (p24). In blood and lymph nodes from fully suppressed individuals, we failed to detect p24+ cells in the absence of stimulation (Fig. S2A,B), which is likely due to the low numbers of cells obtained by fine needle aspirations (FNA; median number of cells analyzed by flow cytometry = 91,342 CD4 T cells). Nevertheless, latently infected cells could be revealed by PMA/ionomycin stimulation in blood samples from all ART-suppressed individuals (data not shown). Detection of productively infected cells in lymph nodes from viremic individuals confirmed the ability of the HIV-Flow assay to detect active production in this tissue. Interestingly, in one individual with low viremia (VL=269), p24+ cells were detected in the lymph nodes but not in the peripheral blood, reinforcing the notion that the lymph node environment favours residual production.

PD-1 negative cells are the major contributor to the total reservoirs in lymph nodes after prolonged ART

Banga *et al* previously showed that HIV transcription persists in PD-1+ cells in virally suppressed individuals [13], with PD-1+ cells containing the highest levels of cell-associated RNA when compared to any other studied subset (CXCR5-PD-1-, CXCR5+PD-1-). Since the median duration of ART was 5 years in this study, we sought to assess the contribution of PD-1+ cells to the total pool of reservoir cells in infected individuals who had been suppressed for a longer time (range = 7.9 to 14.4 years, median=12 years). LNMCs were isolated from 6 lymph node biopsies and 3 populations were sorted by flow-cytometry: memory PD-1+ (Tfh-enriched subset), memory PD-1-, and CD45RA+ cells. We used the stimulated version of TILDA to study the frequency of total reservoirs in sorted subsets (Fig. 2A). Interestingly, only 2 out of 6 memory PD-1+ fractions were positive by TILDA, whereas *tat/rev* RNA were readily detected in memory PD-1- subsets from all participants (Fig. 2A). PD-1 negative cells were the major contributors to the total reservoirs in lymph nodes from long-term suppressed individuals when compared to any other subset (median contribution of PD-1- cells to the total reservoirs = 73.8%; Fig. 2B). Although there was a trend for slightly higher levels of HIV DNA in memory PD-1+ cells compared to PD-1- cells (medians=3,091 and 1,606 copies/10⁶cells in PD-1+ and PD-1- cells, respectively; Fig. S3A), the PD-1- subset was the major contributor to the pool of cells with integrated HIV DNA (median contributions = 56.3 and 39.8% for PD-1- and PD-1+ cells, respectively; Fig. S3B). Overall, these observations indicate that PD-1- cells are the major contributors to viral persistence in lymph nodes from individuals suppressed for more than 8 years, suggesting that the cellular subsets in which HIV preferentially persists may differ between short and long-term suppressed individuals.

Germinal center Tfh cells are rare in long-term suppressed individuals

Our results suggest that the nature of the viral reservoir may be different in short versus long-term suppressed individuals. Therefore, we assessed the phenotypic differences in the T cell populations between these two groups of individuals. The cut-off between short and long-term suppressed individuals (5 years of ART) was defined based on the median time of viral suppression in the aforementioned study by Banga *et al* [13]. Short-term suppressed individuals displayed lower proportions of CD4+ T cells and higher proportions of CD8+ T cells compared to long-term suppressed individuals both in blood and lymph nodes (Fig. 3A), which is consistent with a progressive reconstitution of the CD4 T cells pool during ART. Within the CD4 compartment, transitional memory CD4+ T cells (T_{TM}) were more frequent in lymph nodes from short-term suppressed compared to long-term suppressed individuals, whereas the opposite was observed for the effector memory cells (T_{EM})(Fig.3B).

CXCR5, PD-1 and ICOS which are expressed by follicular helper T cells (Tfh), were consistently expressed at higher levels by CD4+ T cells from short-term suppressed individuals compared to long-term suppressed individuals both in blood and lymph nodes (Fig. 4A). Indeed, the frequencies of GC Tfh cells, defined by high expression levels of CXCR5 and PD-1 (Fig. 4B), were consistently higher in short-term suppressed individuals compared to long-term suppressed individuals ($p=0.0011$, Fig. 4C). Of note, GC Tfh cells were rare in lymph nodes from long-term suppressed individuals (median frequency = 0.6% of total CD4 T cells). We observed a negative correlation between the frequency of GC Tfh cells in lymph nodes and the duration of viral suppression ($p=0.006$, $r=-0.52$; Fig. 4D), giving a potential explanation for the low contribution of PD-1+ cells to the viral reservoir in long-term suppressed individuals.

Different dynamics in the decay of the viral reservoir in blood and lymph nodes during ART

Since we observed a marked decay in the frequency of Tfh cells after prolonged ART, we hypothesized that this phenomenon may have an impact on the size of the viral reservoir in lymph nodes. As expected, duration of ART had no impact on the frequency of persistently infected cells in the blood as measured by the stimulated version of TILDA. In contrast, we observed a clear trend for a negative correlation between the size of the viral reservoir in lymph node and the duration of ART. Although these results need to be confirmed on a larger number of samples, they suggest that the lymphoid reservoir, which is transcriptionally active, may be less stable than the circulating reservoir in which latency prevails.

Discussion

Despite the success of ART in reducing the plasma viral load below detectable levels, the persistence of HIV in various anatomical and cellular sanctuaries is a major barrier to HIV eradication [1-3]. Because of their immunoprivileged microenvironment, lymph nodes are a major site for HIV replication and persistence in people living with HIV [6-13]. Therefore, the development of novel curative strategies requires a deep understanding of HIV persistence in this anatomic compartment.

Although the majority of CD4 T cells from the peripheral blood are transcriptionally inactive [29], recent data suggest that residual transcription occurs in lymph nodes [10, 13, 31, 32] but little is known about the contribution of latency to HIV persistence in this compartment. We took advantage of the TILDA assay [29] to measure the relative contributions of latency and residual transcription in this anatomic compartment. In the blood, the frequency of cells expressing multiplispliced RNA was significantly higher after PMA/ionomycin stimulation, confirming previous results showing that most infected cells are latently infected in the blood from ART-suppressed individuals [29]. Significantly higher frequencies of CD4 T cells expressing RNA spontaneously were observed in lymph nodes compared to blood, and the median frequency was not significantly increased after PMA/ionomycin stimulation. These observations suggest that, in contrast to the blood, the majority of the CD4 T cells are transcriptionally active in the lymph nodes. Higher levels of HIV RNA transcription in the lymph nodes may be attributed to a suboptimal penetration of ART in this anatomic compartment [37], a poor functionality of the cytotoxic CD8 T cells [14, 17] and cytolytic CD4 T cells [38], a constant local inflammation [39] and a heightened degree of cellular activation in this lymphoid tissue due to a high cellular density.

We took advantage of a recently developed flow cytometry-based assay allowing the detection of p24+ cells to determine if translation of viral proteins occurs in lymph nodes [36]. We failed to detect p24+ cells in the FNA from fully suppressed individuals, which is likely due to the low number of CD4 T cells analyzed. Future studies will be needed to determine if the absence of p24+ detection in the lymph nodes from fully suppressed individuals is due to the insufficient number of CD4 T cells obtained by FNA or to an absence of residual production in this compartment.

In the study performed by Banga *et al* in which the median time of treatment was 5 years [13], lymph nodes PD-1+ cells were identified as the major CD4 T cell compartment for the production of replication competent viruses. By using the stimulated version of TILDA on lymph node samples from people suppressed for more than 8 years, we showed that only 2/6 samples displayed detectable levels of *tat/rev* RNA in the PD-1+ subset whereas these transcripts were detected in the PD-1- subset from all 6 participants. Overall, PD-1 negative cells were the main contributors to the pool of cells with inducible transcription and to the pool of cells harbouring integrated HIV

DNA in this group of individuals on prolonged therapy. This is in line with data from the blood showing that, in a ART-suppressed group of participants in whom the median time of treatment was 13 years, non-pTfh cells had a higher contribution to the total pool of cells with HIV DNA when compared to pTfh cells [40]. Moreover, it was recently shown that CTLA-4+PD-1- cells, localized outside of the lymph node B cell follicles, are enriched in viral DNA both in ART treated SIV-infected macaques and HIV-infected individuals. Notably, this subset of infected CTLA-4+PD-1- cells increased its contribution to the pool of SIV DNA+ cells with the time of viral suppression [41]. It is known that HIV replication induces the downregulation of PD-1, and to a lesser extent CXCR5 [26]. Therefore, if residual replication occurs in lymph nodes from virally suppressed individuals, the productively infected cells will become PD-1 negative and CXCR5 negative, favouring the exclusion of these cells from the B cell follicles. Altogether, these results suggest that different CD4 compartments may be the main site of viral persistence in short and long-term suppressed individuals, highlighting the importance of taking into account the time of viral suppression for the development of new curative strategies.

Since our results suggest that the nature of the viral reservoirs may be different between short and long-term suppressed individuals, we hypothesized that phenotypic changes would occur with the course of treatment. Phenotypic analyses were performed on samples from short-term suppressed individuals (suppressed for less than 5 years) and long-term suppressed individuals (suppressed for more than 5 years) in lymph nodes and matched peripheral blood samples. Proportions of CD4 T cells were lower in short-term suppressed compared to long-term suppressed individuals, both in the blood and lymph nodes. This is in line with a previous study showing that CD4 counts continue to increase up to 10 years after ART initiation [42]. We also showed that GC Tfh are rare in the lymph nodes from long-term suppressed individuals, representing only 0.6% of the total CD4 T cells in this compartment. As previously described, Tfh frequencies progressively decreased with the time of suppression. This progressive decline is in line with the relatively low contribution of PD-1+ cells to the pool of infected cells in long-term suppressed individuals. Moreover, the frequency of transitional memory cells was higher in lymph nodes from short-term compared to long-term suppressed individuals which is consistent with the fact that Tfh cells from lymph nodes often display a T_{TM} phenotype (data not shown).

It is well described that follicular regulatory CD4 T cells also express CXCR5, PD-1 and ICOS [43]. Therefore, the PD-1+ subset we studied comprises both Tfh cells and Tfr cells and our strategy does not allow us to discriminate between these two subsets. Moreover, although we observed that HIV transcription is a prevalent phenomenon in the lymph nodes from virally suppressed individuals, several lines of evidence indicate the lack of viral diversification in blood and lymph nodes from ART-suppressed individuals [34, 44-46], which is consistent with the absence of a decrease in residual viremia following treatment intensification [47-50]. These

observations suggest that HIV transcription and translation may occur in lymph nodes from people under ART in the absence of new replication cycles.

In conclusion, this study highlights significant phenotypic changes between short-term suppressed and long-term suppressed individuals and suggests that different CD4 compartments support HIV persistence in these 2 groups of individuals. We identified active transcription as a prevalent phenomenon in the lymph nodes in contrast to the blood, suggesting that differential strategies may be needed to eliminate these distinct reservoirs. Importantly, our results suggest that a prolonged duration of ART may shape the reservoir towards a more latent state in the lymph nodes, which has implications for HIV curative strategies.

Acknowledgements

The study team is grateful to the individuals who volunteered to participate in this study. We also thank the flow cytometry core at the CRCHUM, managed by Dominique Gauchat and Philippe St-Onge; and the NC3 core, managed by Olfa Debbeche.

Funding

This work was supported by the Delaney AIDS Research Enterprise (DARE) to Find a Cure (UM1AI126611), the Canadian Institutes for Health Research (CIHR, #364408, #377124 and #385806), the Foundation for AIDS Research (amfAR, Research Consortium on HIV Eradication 108687-54-RGRL and 108928-56-RGRL), the réseau SIDA et maladies infectieuses du Fonds de Recherche du Québec - Santé (FRQS) and The Canadian HIV Cure Enterprise Team Grant HIG-133050 from the CIHR in partnership with CANFAR and IAS. NC is supported by Research Scholar Career Awards of the Quebec Health Research Fund (FRQ-S, NC: #253292). MP is supported by a fellowship from Wallonie Bruxelles International.

Competing Interests

The authors have declared that no competing interests exist.

Material and Methods

Participant and samples

24 HIV-infected individuals on stably suppressive ART for 0.1 to 18.9 years and 7 viremic individuals were recruited at UCSF for this study. Few participants (n=5) contributed to two longitudinal samples. Characteristics of the participants are summarized in Table 1. All participants signed informed consent approved by the UCSF (CA, USA) and the CHUM hospital (QC, Canada) review boards (IRB Ref # 068192 and FWA #00004139, respectively). Lymph node mononuclear cells were obtained by inguinal lymph nodes biopsies (n = 6) or fine needle aspirates (n = 30). Matched peripheral blood samples were obtained and PBMCs were isolated by Ficoll density gradient centrifugation.

Biopsies and fine needle aspirates (FNA) processing

All biological samples were shipped overnight and processed immediately after reception. For blood samples, PBMCs were isolated by Ficoll density gradient centrifugation. For biopsies, fat tissue surrounding the lymph node was removed manually and single cell suspension was obtained by mechanical disruption. For cells obtained by FNAs, cell suspensions were treated with ACK. LNMCs from biopsies and FNA were then enriched for CD4 T cells by negative magnetic selection using the EasySep™ Human CD4 T Cell Enrichment Kit (StemCell Technology, 19052). CD4 T cells from biopsies were cell sorted by flow cytometry, whereas total CD4 T cells from FNA were used for future applications (quantification of integrated viral DNA, TILDA and HIV-Flow). When less than 200,000 cells were obtained from lymph nodes, total LNMCs were used for future applications.

Antibodies

Live/Dead Aqua Cell Stain (405nm) (L34957) and CD4 S3.5 Qdot605 (Q10008) were obtained from ThermoFisher Scientific. CD3 UCHT-1 A700 (557943), CD4 RPA-T4 BV421 (562424) and CD4 SK3 BUV496 (564651), CD8 RPA-T8 PerCPCy5.5 (560662) and BUV395 (563795), CD45RA HI100 BUV737 (564442) and APC-H7 (560674) and BV786 (563870), CCR7 3D12 Pe-Cy7 (557648), CXCR5 RF8B2 BB515 (564624), PD-1 EH12.1 AF647 (560838) and BUV737 (565299) were purchased from BD Biosciences. CD27 O323 BV650 (302828) and ICOS C398.4A BV421 (313523) were obtained from Biolegend.

Immunophenotyping

LNMCs and PBMCs from the n=18 ART-suppressed individuals were stained with Live/Dead Aqua Cell Stain, CD3 A700, CD4 Qdot605, CD8 PerCPCy5.5, CD45RA BUV737, CCR7 Pe-Cy7, CD27

BV650, PD-1 AF647, CXCR5 BB515 and ICOS BV421 (30min, 4°C). Cells were then fixed with PBS/2% Formaldehyde and analyzed by flow cytometry on a BD LSRII.

Flow cytometry cell sorting

CD4 T cells from the 6 biopsies were stained with Live/Dead Aqua Cell Stain, CD3 UCHT-1 A700, CD4 BV421, CD8 PerCPCy5.5, CD45RA APC-H7, PD-1 AF647, and CXCR5 BB515 (30min, 4°C). The following cell subsets were sorted by flow cytometry: Tfh-enriched cells (CD3+CD8-CD45RA-CXCR5+/-PD-1+), non-Tfh cells (CD3+CD8-CD45RA-CXCR5+/-PD-1-) and CD3+CD8-CD45RA+ cells. Sorted subsets were used to quantify integrated HIV DNA, and to perform TILDA.

Quantification of integrated HIV DNA

Frequencies of CD4⁺ T cells harboring integrated HIV DNA were measured by real time nested PCR, as previously described [35]. Briefly, cells were lysed by proteinase K digestion and cell lysates were directly used for HIV DNA quantifications. Integrated HIV DNA was amplified with Alu primers together with a primer annealing the LTR. In all PCR reactions, primers specific for the CD3 gene were added to precisely quantify the cell input. In a second round of PCR, appropriate primers and probes were used to amplify HIV sequences from the first round of amplification. Inner primers specific for the CD3 gene were used in a separate reaction. The numbers of integrated HIV DNA copies were calculated by using serial dilutions of lysed ACH-2 cells as a standard curve. Results were expressed as numbers of HIV copies per million cells.

Tat/rev Induced Limiting Dilution Assay (TILDA)

The frequency of CD4⁺ T cells with multiply spliced HIV RNA was determined using the tat/rev inducible limiting dilution assay (TILDA), as previously described [29]. Frequencies of reservoir cells with active transcription and total reservoirs were measured in total CD4 T cells using the unstimulated and stimulated versions of the assay, respectively.

HIV-Flow

The frequency of p24⁺ cells was determined as previously described [36]. Briefly, purified CD4 T cells or total mononuclear cells from FNA and blood were rested or stimulated with 25nM or 162nM PMA (Sigma, P8139) and with 1µg/mL ionomycin (Sigma, I9657) for 18 to 22h. Cells were then collected, resuspended in PBS and stained with the Aqua Live/Dead staining kit for 30min at 4°C. The extracellular staining was performed in PBS/4% Human Serum for 30min at 4°C. The fixation/permeabilization step was performed with the FoxP3 Transcription Factor Staining Buffer Set (eBioscience, 00-5523-00) following the manufacturer's instructions. Cells were then stained with anti-p24 KC57 and anti-p24 28B7 antibodies for an additional 45min at RT. Cells were

analyzed by flow cytometry on a BD LSRII. A detailed laboratory protocol describing all steps of the HIV-Flow procedure can be accessed here:

dx.doi.org/10.17504/protocols.io.w4efgte.

Statistical analyses

All data were analyzed using Graphpad Prism v6.0h. Results were represented as median values with interquartile range, as indicated in the figure legends. For phenotypic comparisons between short-term suppressed and long-term suppressed individuals, non-parametric Mann-Whitney tests were used. For TILDA and integrated HIV DNA measurements, non-parametric Wilcoxon matched-pairs signed rank tests were used. Correlations were determined using nonparametric Spearman's tests. P values of less than 0.05 were considered statistically significant.

References

1. Finzi, D., et al., *Identification of a reservoir for HIV-1 in patients on highly active antiretroviral therapy*. Science, 1997. **278**(5341): p. 1295-300.
2. Wong, J.K., et al., *Recovery of replication-competent HIV despite prolonged suppression of plasma viremia*. Science, 1997. **278**(5341): p. 1291-5.
3. Chun, T.W., et al., *Presence of an inducible HIV-1 latent reservoir during highly active antiretroviral therapy*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(24): p. 13193-7.
4. Saez-Cirion, A., et al., *Post-treatment HIV-1 controllers with a long-term virological remission after the interruption of early initiated antiretroviral therapy ANRS VISCONTI Study*. PLoS Pathog, 2013. **9**(3): p. e1003211.
5. Wong, J.K. and S.A. Yukl, *Tissue reservoirs of HIV*. Curr Opin HIV AIDS, 2016. **11**(4): p. 362-70.
6. Tenner-Racz, K., et al., *Ultrastructural analysis of germinal centers in lymph nodes of patients with HIV-1-induced persistent generalized lymphadenopathy: evidence for persistence of infection*. Prog AIDS Pathol, 1989. **1**: p. 29-40.
7. Tenner-Racz, K., et al., *The unenlarged lymph nodes of HIV-1-infected, asymptomatic patients with high CD4 T cell counts are sites for virus replication and CD4 T cell proliferation. The impact of highly active antiretroviral therapy*. J Exp Med, 1998. **187**(6): p. 949-59.
8. Folkvord, J.M., C. Armon, and E. Connick, *Lymphoid follicles are sites of heightened human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) replication and reduced antiretroviral effector mechanisms*. AIDS Res Hum Retroviruses, 2005. **21**(5): p. 363-70.
9. Hufert, F.T., et al., *Germinal centre CD4+ T cells are an important site of HIV replication in vivo*. AIDS, 1997. **11**(7): p. 849-57.
10. Deleage, C., et al., *Defining HIV and SIV Reservoirs in Lymphoid Tissues*. Pathog Immun, 2016. **1**(1): p. 68-106.
11. Fukazawa, Y., et al., *B cell follicle sanctuary permits persistent productive simian immunodeficiency virus infection in elite controllers*. Nat Med, 2015. **21**(2): p. 132-9.
12. Perreau, M., et al., *Follicular helper T cells serve as the major CD4 T cell compartment for HIV-1 infection, replication, and production*. J Exp Med, 2013. **210**(1): p. 143-56.
13. Banga, R., et al., *PD-1(+) and follicular helper T cells are responsible for persistent HIV-1 transcription in treated aviremic individuals*. Nat Med, 2016. **22**(7): p. 754-61.
14. Connick, E., et al., *CTL fail to accumulate at sites of HIV-1 replication in lymphoid tissue*. J Immunol, 2007. **178**(11): p. 6975-83.

15. Connick, E., et al., *Compartmentalization of simian immunodeficiency virus replication within secondary lymphoid tissues of rhesus macaques is linked to disease stage and inversely related to localization of virus-specific CTL*. J Immunol, 2014. **193**(11): p. 5613-25.
16. Petrovas, C., et al., *Follicular CD8 T cells accumulate in HIV infection and can kill infected cells in vitro via bispecific antibodies*. Sci Transl Med, 2017. **9**(373).
17. Reuter, M.A., et al., *HIV-Specific CD8(+) T Cells Exhibit Reduced and Differentially Regulated Cytolytic Activity in Lymphoid Tissue*. Cell Rep, 2017. **21**(12): p. 3458-3470.
18. Smith, B.A., et al., *Persistence of infectious HIV on follicular dendritic cells*. J Immunol, 2001. **166**(1): p. 690-6.
19. Dave, R.S., P. Jain, and S.N. Byrareddy, *Follicular Dendritic Cells of Lymph Nodes as Human Immunodeficiency Virus/Simian Immunodeficiency Virus Reservoirs and Insights on Cervical Lymph Node*. Front Immunol, 2018. **9**: p. 805.
20. Miles, B., et al., *Follicular regulatory T cells impair follicular T helper cells in HIV and SIV infection*. Nat Commun, 2015. **6**: p. 8608.
21. Miles, B., et al., *Follicular Regulatory CD8 T Cells Impair the Germinal Center Response in SIV and Ex Vivo HIV Infection*. PLoS Pathog, 2016. **12**(10): p. e1005924.
22. Wollenberg, I., et al., *Regulation of the germinal center reaction by Foxp3+ follicular regulatory T cells*. J Immunol, 2011. **187**(9): p. 4553-60.
23. Kim, H.J., et al., *Inhibition of follicular T-helper cells by CD8(+) regulatory T cells is essential for self tolerance*. Nature, 2010. **467**(7313): p. 328-32.
24. Crotty, S., *Follicular helper CD4 T cells (TFH)*. Annu Rev Immunol, 2011. **29**: p. 621-63.
25. Yu, D. and C.G. Vinuesa, *The elusive identity of T follicular helper cells*. Trends Immunol, 2010. **31**(10): p. 377-83.
26. Kohler, S.L., et al., *Germinal Center T Follicular Helper Cells Are Highly Permissive to HIV-1 and Alter Their Phenotype during Virus Replication*. J Immunol, 2016. **196**(6): p. 2711-22.
27. Petrovas, C., et al., *CD4 T follicular helper cell dynamics during SIV infection*. J Clin Invest, 2012. **122**(9): p. 3281-94.
28. Yukl, S.A., et al., *HIV latency in isolated patient CD4(+) T cells may be due to blocks in HIV transcriptional elongation, completion, and splicing*. Sci Transl Med, 2018. **10**(430).
29. Procopio, F.A., et al., *A Novel Assay to Measure the Magnitude of the Inducible Viral Reservoir in HIV-infected Individuals*. EBioMedicine, 2015. **2**(8): p. 874-83.
30. DeMaster, L.K., et al., *A Subset of CD4/CD8 Double-Negative T Cells Expresses HIV Proteins in Patients on Antiretroviral Therapy*. J Virol, 2015. **90**(5): p. 2165-79.
31. Estes, J.D., et al., *Defining total-body AIDS-virus burden with implications for curative strategies*. Nat Med, 2017. **23**(11): p. 1271-1276.

32. Baiyegunhi, O.O., F.; Ismail, N.; Dong, K.; Walker, B.D.; Ndungú, T.; Ndhlovu, Z. *HIV RNA persists long-term in lymph nodes of individuals initiated on ART in fiebig I.* in *CROI*. 2018. Boston, Massachusetts.
33. Lorenzo-Redondo, R., et al., *Persistent HIV-1 replication maintains the tissue reservoir during therapy.* *Nature*, 2016. **530**(7588): p. 51-56.
34. Kearney, M.F., et al., *Ongoing HIV Replication During ART Reconsidered.* *Open Forum Infect Dis*, 2017. **4**(3): p. ofx173.
35. Vandergeeten, C., et al., *Cross-clade ultrasensitive PCR-based assays to measure HIV persistence in large-cohort studies.* *J Virol*, 2014. **88**(21): p. 12385-96.
36. Pardons, M., et al., *Single-cell characterization and quantification of translation-competent viral reservoirs in treated and untreated HIV infection.* *PLoS Pathog*, 2019. **15**(2): p. e1007619.
37. Fletcher, C.V., et al., *Persistent HIV-1 replication is associated with lower antiretroviral drug concentrations in lymphatic tissues.* *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2014. **111**(6): p. 2307-12.
38. Buggert, M., et al., *Limited immune surveillance in lymphoid tissue by cytolytic CD4+ T cells during health and HIV disease.* *PLoS Pathog*, 2018. **14**(4): p. e1006973.
39. Tawakol, A., et al., *Association of Arterial and Lymph Node Inflammation With Distinct Inflammatory Pathways in Human Immunodeficiency Virus Infection.* *JAMA Cardiol*, 2017. **2**(2): p. 163-171.
40. Garcia, M., et al., *Peripheral T follicular helper Cells Make a Difference in HIV Reservoir Size between Elite Controllers and Patients on Successful cART.* *Sci Rep*, 2017. **7**(1): p. 16799.
41. McGary, C.S., et al., *CTLA-4(+)/PD-1(-) Memory CD4(+) T Cells Critically Contribute to Viral Persistence in Antiretroviral Therapy-Suppressed, SIV-Infected Rhesus Macaques.* *Immunity*, 2017. **47**(4): p. 776-788 e5.
42. Bishop, J.D., et al., *CD4 Count Recovery After Initiation of Antiretroviral Therapy in Patients Infected With Human Immunodeficiency Virus.* *Am J Med Sci*, 2016. **352**(3): p. 239-44.
43. Xie, M.M. and A.L. Dent, *Unexpected Help: Follicular Regulatory T Cells in the Germinal Center.* *Front Immunol*, 2018. **9**: p. 1536.
44. Kearney, M.F., et al., *Lack of detectable HIV-1 molecular evolution during suppressive antiretroviral therapy.* *PLoS Pathog*, 2014. **10**(3): p. e1004010.
45. Josefsson, L., et al., *The HIV-1 reservoir in eight patients on long-term suppressive antiretroviral therapy is stable with few genetic changes over time.* *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013. **110**(51): p. E4987-96.
46. Vancoillie, L., et al., *Longitudinal sequencing of HIV-1 infected patients with low-level viremia for years while on ART shows no indications for genetic evolution of the virus.* *Virology*, 2017. **510**: p. 185-193.

47. Dinoso, J.B., et al., *Treatment intensification does not reduce residual HIV-1 viremia in patients on highly active antiretroviral therapy*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(23): p. 9403-8.
48. Gandhi, R.T., et al., *The effect of raltegravir intensification on low-level residual viremia in HIV-infected patients on antiretroviral therapy: a randomized controlled trial*. PLoS Med, 2010. **7**(8).
49. McMahon, D., et al., *Short-course raltegravir intensification does not reduce persistent low-level viremia in patients with HIV-1 suppression during receipt of combination antiretroviral therapy*. Clin Infect Dis, 2010. **50**(6): p. 912-9.
50. Rasmussen, T.A., et al., *The effect of antiretroviral intensification with dolutegravir on residual virus replication in HIV-infected individuals: a randomised, placebo-controlled, double-blind trial*. Lancet HIV, 2018. **5**(5): p. e221-e230.

Figure 1

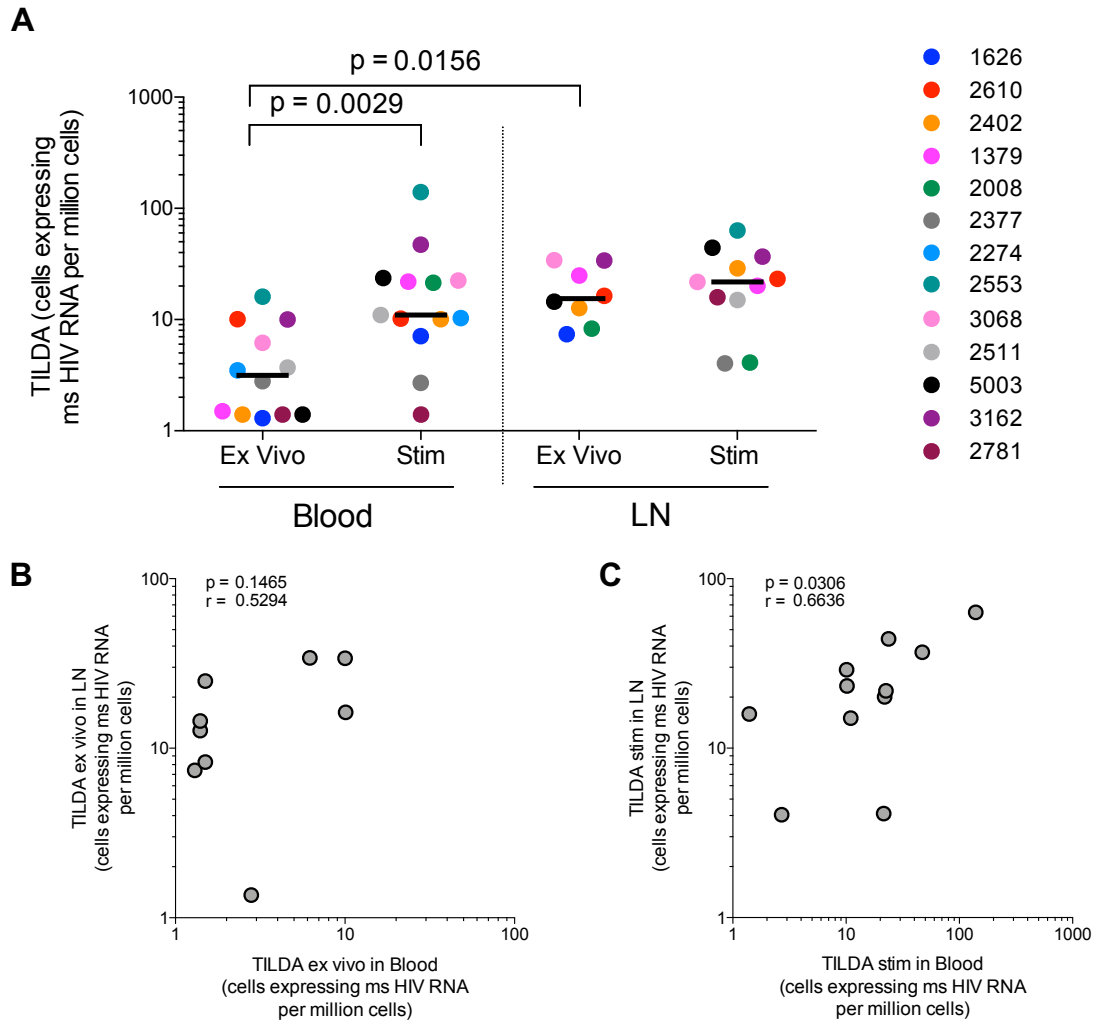


Figure 1. Levels of active transcription are higher in lymph nodes than in blood in virally suppressed individuals. A) Frequencies of cells expressing msRNA spontaneously (ex vivo) or after a 12h-PMA/ionomycin stimulation (stim) in the blood and lymph nodes from n=13 virally suppressed individuals. Undetectable values are not represented. Medians and statistically significant p values are represented on the graph. For statistical analyses, non-parametric Wilcoxon tests were used. B-C) Correlations between the frequencies of cells expressing msRNA spontaneously in the blood and lymph nodes (B), between the total reservoirs (stim) in the blood and lymph nodes (C). For statistical analyses, non-parametric Spearman's tests were used.

Figure 2

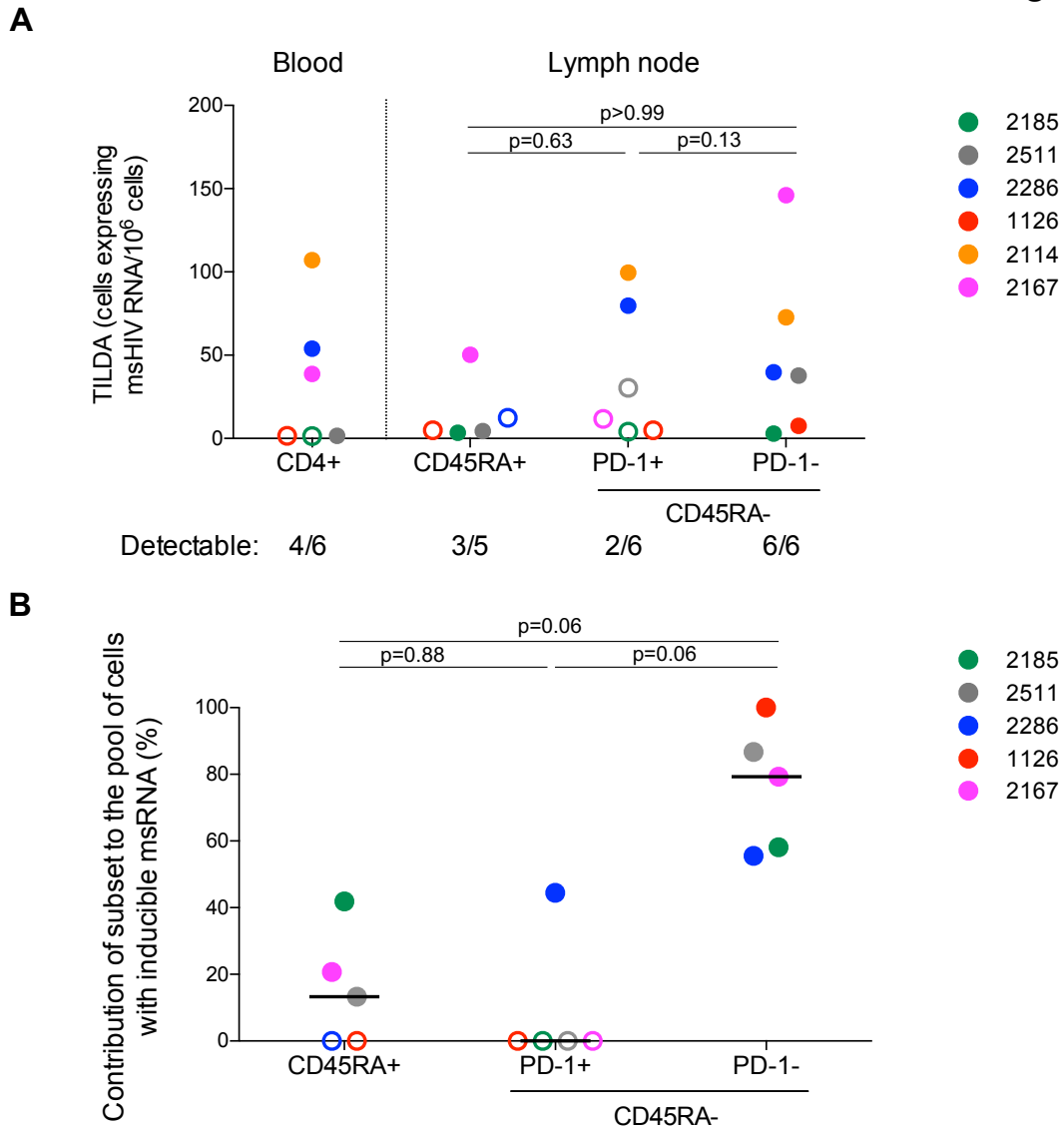


Figure 2. PD-1 negative cells are the major contributors to the pool of cells with inducible msRNA in lymph nodes from long-term suppressed individuals. A) TILDA measurements obtained after a 12h-PMA/ionomycin stimulation of total CD4 T cells from the blood and sorted CD4 T cell subsets from lymph nodes in n=6 long-term suppressed individuals. Undetectable measurements are represented by opened symbols and limits of detection are plotted. B) Contribution of the subsets to the pool of cells with inducible msRNA in the lymph nodes from n=5 long-term suppressed individuals. For statistical analyses, non-parametric Wilcoxon tests were used.

Figure 3

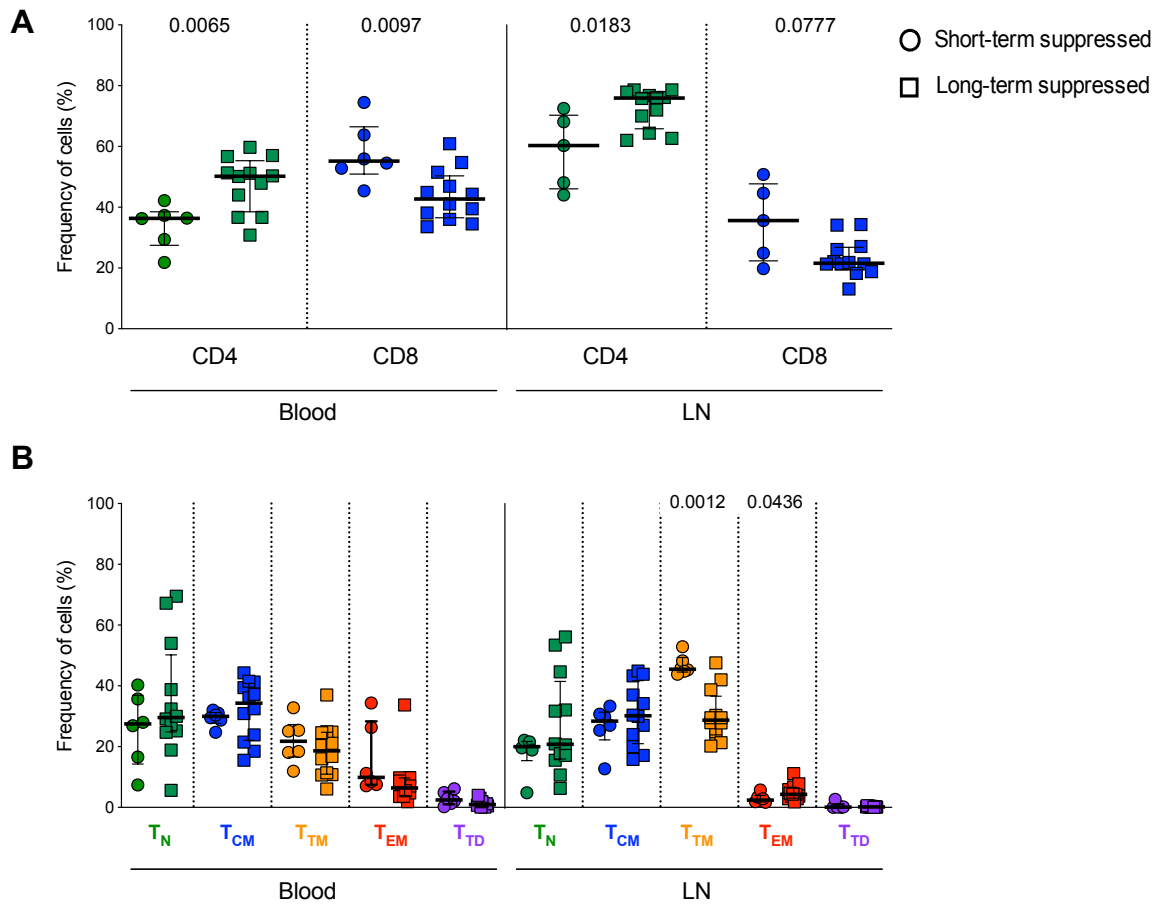


Figure 3. Phenotypic differences between short and long-term suppressed individuals in the blood and lymph nodes. A) Proportions of CD4 and CD8 T cells in total lymphocytes. B) Frequency of cells displaying a T_N , T_{CM} , T_{TM} , T_{EM} , T_{TD} phenotype among the CD4+ T cells. Circles represent short-term suppressed individuals, whereas squares represent long-term suppressed individuals. Medians, interquartile ranges and statistically significant p values are represented on the graphs. For comparisons between short and long-term suppressed individuals, non-parametric Mann-Whitney tests were used.

Figure 4

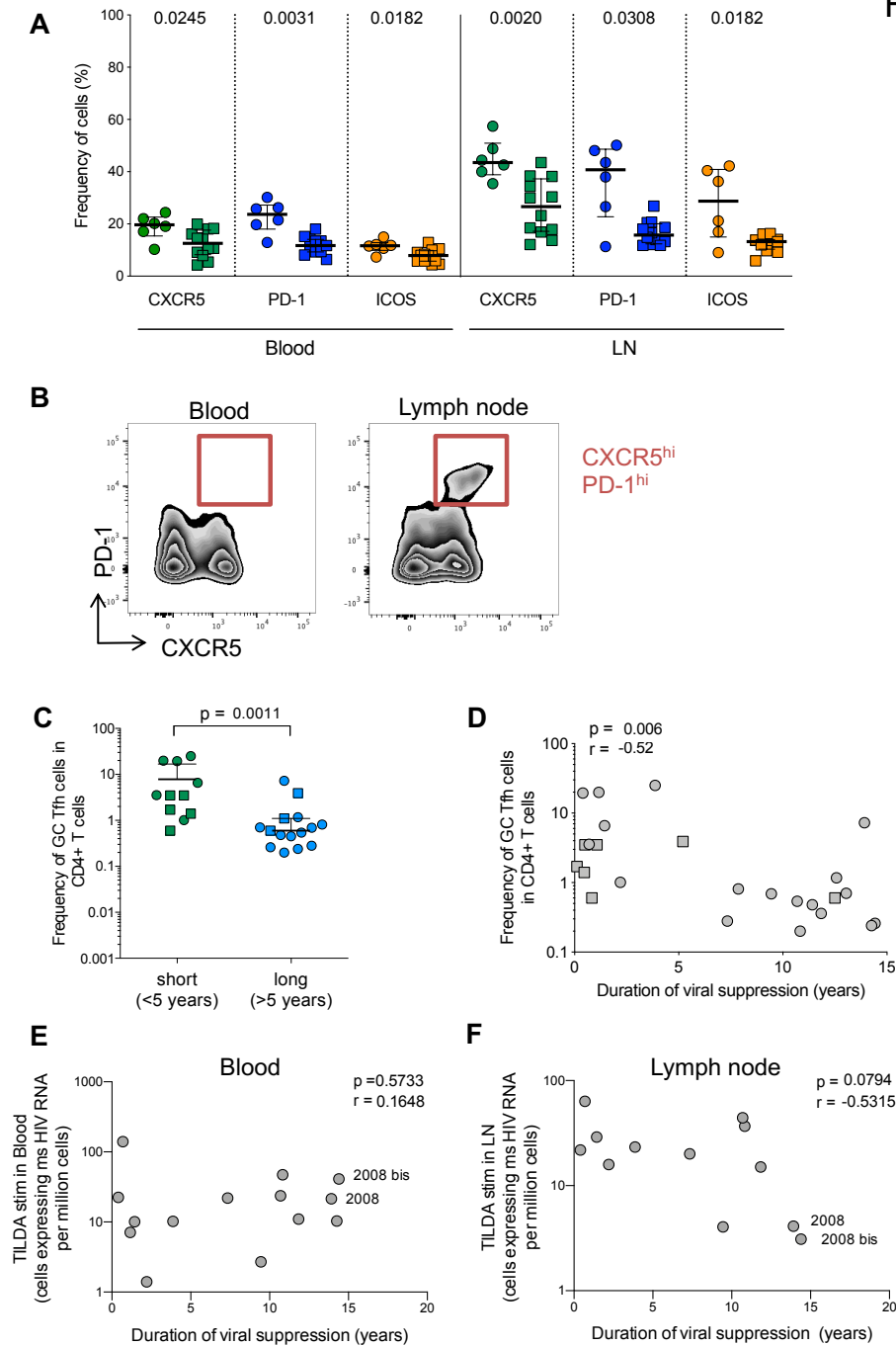


Figure 4. Tfh cells are rare in long-term suppressed individuals. A) Frequency of cells expressing CXCR5, PD-1 and ICOS among the CD4⁺ T cells. B) Representative dot plots showing the co-staining CXCR5/PD-1 in blood and lymph nodes from an ART-suppressed individual. The red square represents CD45RA-CXCR5^{high}PD-1^{high} GC Tfh cells. C) Frequency of GC Tfh cells in CD4⁺ T cells from short-term suppressed and long-term suppressed individuals in the lymph nodes. Circles represent phenotypic measurements obtained on samples used for the TILDA assay, whereas squares represent phenotypic measurements obtained on samples used for the HIV-Flow assay. Medians, interquartile ranges and statistically significant p values are represented on the graphs. For statistical analyses, non-parametric Wilcoxon tests were used. D) Correlation between the frequency of GC Tfh cells and the duration of viral suppression. E-F) Correlations between the size of the reservoir (as measured by stimulated TILDA) and the duration of viral suppression in the blood (E) or in lymph nodes (F). For statistical analyses, non-parametric Spearman's test was used.

Table 1: Characteristics of the participants

PID	Gender	Ethnicity	Age (years)	Viral suppression (years)	CD4	CD8	Ratio CD4/CD8	VL	ART Regimen	Biopsy	FNA	TILDA	HIV-Flow
1126	Male	White	69	7.9	873	886	1.0	<40	EFV/TDF/FTC	x		x	
2511	Male	White	48	10.1	501	421	1.2	<40	EFV/TDF/FTC, RGV	x		x	
2114	Male	White	74	11.4	639	1317	0.5	<40	FTC/TDF, DTG	x		x	
2185	Male	African American	60	12.6	410	264	1.6	<40	EFV/TDF/FTC	x		x	
2286	Male	White	50	13.0	540	489	1.1	<40	RPV/TDF/FTC	x		x	
2167	Male	White	60	14.4	730	741	1.0	<40	3TC, TDF, NFV	x		x	
3068	Male	Hispanic/Latino	65	0.4	333	889	0.4	44	DTG, RPV		x	x	
2553	Female	Hispanic/Latino	35	0.7	565	981	0.6	<40	ABC/3TC, ATV, RTV		x	x	
1626	Male	Hispanic/Latino	52	1.2	403	1059	0.4	<40	DTG/ABC/3TC		x	x	
2402	Male	African American	41	1.4	613	713	0.9	122	RPV/TDF/FTC, RTV, DRV		x	x	
2781	Male	White	43	2.2	422	665	0.6	<40	ABC/DTG/3TC		x	x	
2610	Male	White	54	3.9	804	854	0.9	<40	DTG/ABC/3TC		x	x	
1379	Male	African American	49	7.3	763	954	0.8	<40	FTC/TDF, RTV, DRV		x	x	
2377	Male	White	63	9.5	544	608	0.9	<40	ABC/DTG/3TC		x	x	
5003	Male	Hispanic/Latino	47	10.7	253	394	0.6	<40	ATV, ABC/DTG/3TC		x	x	
3162	Male	White	56	10.8	454	415	1.1	<40	RTV, DRV, ABC/DTG/3TC		x	x	
2511*	Male	White	50	11.8	353	373	0.9	<40	EFV/TDF/FTC, RGV		x	x	
2008	Male	White	62	13.9	485	607	0.8	<40	ABC/DTG/3TC		x	x	
2274	Male	White	56	14.3	336	272	1.2	<40	NVP, FTC/TAF		x	x	
2008*	Male	White	62	14.4	511	647	0.8	<40	ABC/DTG/3TC		x	x	
3675	Male	African American	36	N.A	216	1176	0.2	84165	N.A		x		x
2408	Male	Hispanic/Latino	53	N.A	192	658	0.3	74534	N.A		x		x
1642	Male	African American	56	N.A	183	986	0.2	65407	N.A		x		x
3652	Male	White	46	N.A	518	2041	0.3	7528	N.A		x		x
1048	Female	African American	52	N.A	52	480	0.1	1104	DRV, RTV, AZT/3TC (Viremic on ART)		x		x
2505	Male	White	49	N.A	588	498	1.2	269	PRO-140		x		x
2706	Male	White	62	N.A	872	1050	0.8	66	PRO-140		x		x
1027	Female	White	62	0.1	427	677	0.6	<40	EGV/TAF/FTC/COBI		x		x
8097	Male	Asian	36	0.2	756	767	1.0	<40	ABC/TCV/3TC		x		x
2402*	Male	African American	42	0.5	823	906	0.9	<40	BIC/FTC/TAF		x		x
2690	Female	Hispanic/Latino	54	0.5	495	547	0.9	<40	BIC/FTC/TAF		x		x
2463	Male	White	50	0.8	655	3013	0.2	<40	MVR, DRV/COBI		x		x
3068*	Male	White	65	1.1	316	999	0.3	<40	DTG, RPV		x		x
2610*	Male	White	55	5.2	817	864	0.9	<40	ABC/DTG/3TC		x		x
3037	Male	African American	61	12.5	276	636	0.4	<40	TDF, AZT/3TC/ABC, ETV, RTV, DRV		x		x
2168	Male	African American	58	18.9	248	674	0.4	<40	ABC/DTG/3TC		x		x
Median			54	7.9	498	695	0.8						
IQ range			[48-61]	[1.1-12.5]	[335-643]	[535-961]	[0.4-1.0]						

Time of viral suppression is indicated in bold for short-term suppressed individuals

VL: viral load; N.A: not applicable

* Individuals for whom we received a second sample

Figure S1

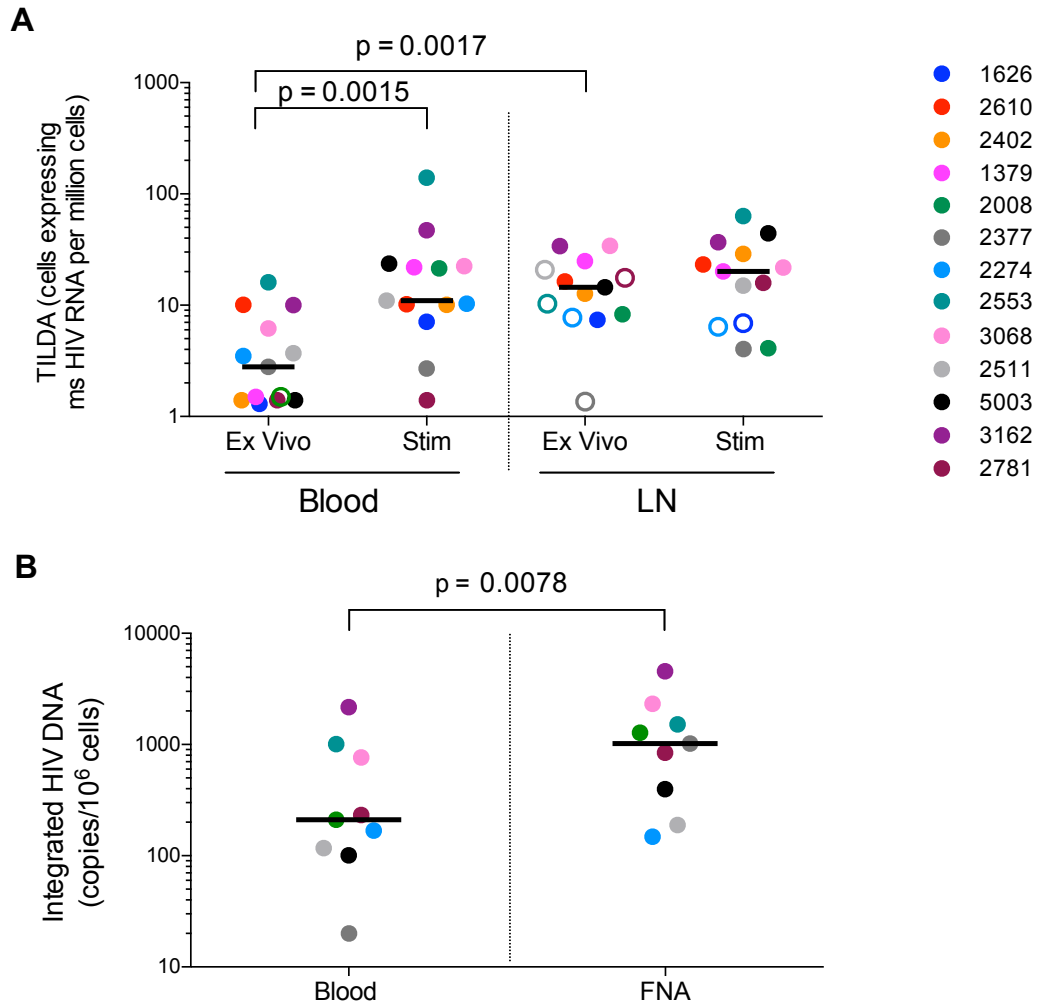
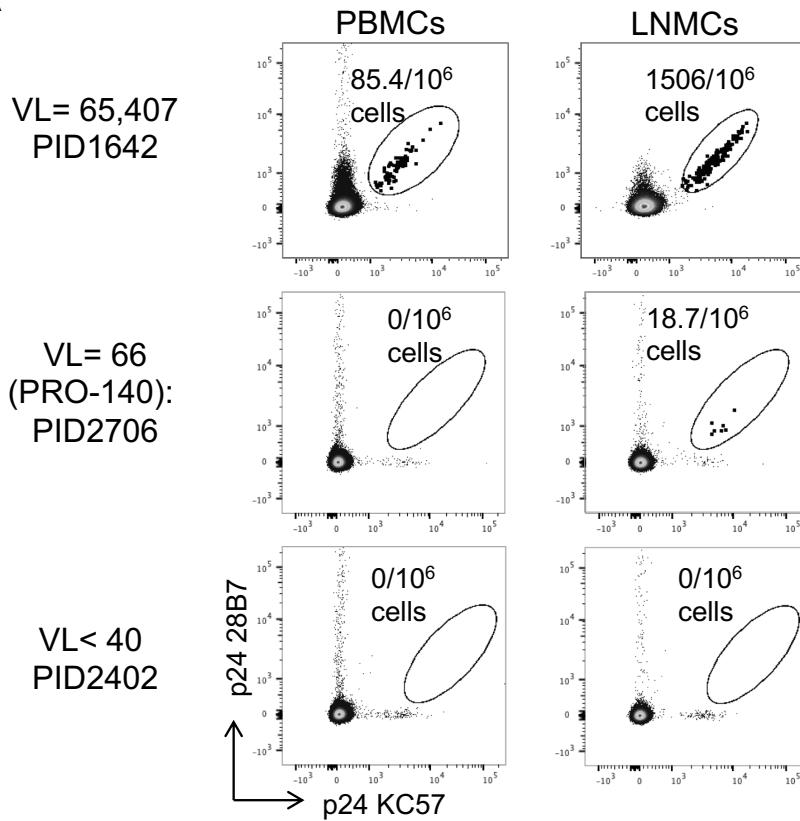


Figure S1. Levels of active transcription are higher in the lymph nodes than in blood in virally suppressed individuals. A) Frequencies of cells expressing msRNA spontaneously (ex vivo) or after a 12h-PMA/Ionomycin stimulation (stim) in the blood and lymph nodes from n=13 virally suppressed individuals. Undetectable measurements are represented by opened symbols and limits of detection are plotted. Medians and statistically significant p values are represented on the graph. For statistical analyses, a non-parametric Wilcoxon test was used. B) Levels of integrated HIV DNA in the blood and lymph nodes from n=9 virally suppressed individuals.

A



B

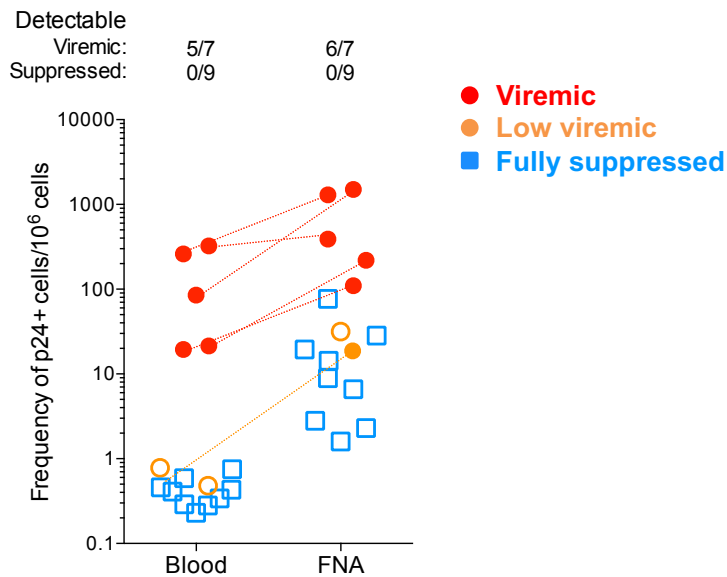


Figure S2. Productively infected cells are not detected in the lymph nodes from virally suppressed individuals. A) Representative dot plots showing the co-staining p24 KC57-PE/p24 28B7-APC in circulating (left panel) and lymph node CD4 T cells (right panel) obtained from one viremic individual, one low viremic individual and one fully suppressed individual. B) Frequency of p24+ cells measured by HIV-Flow in the absence of stimulation. Undetectable measurements are represented by opened symbols and limits of detection are plotted.

Figure S3

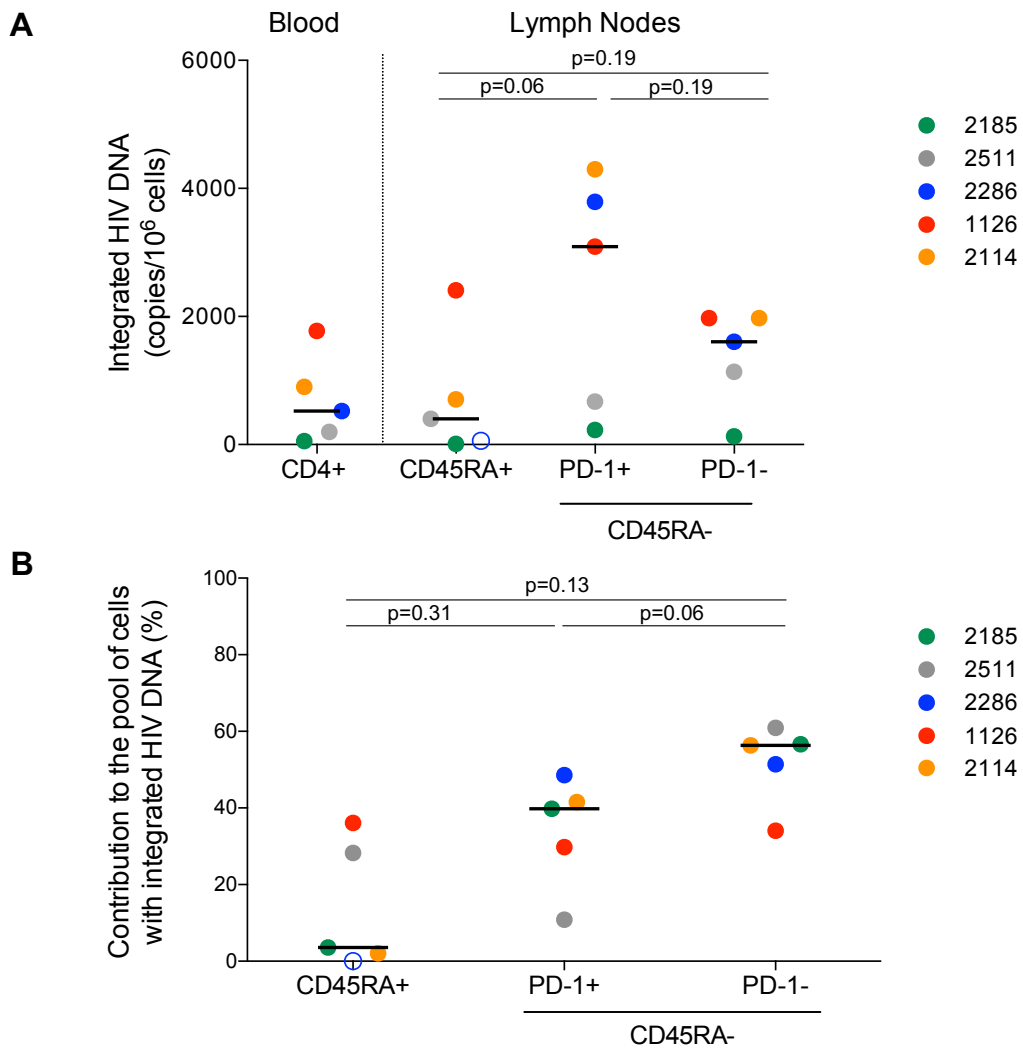


Figure S3. PD-1 negative cells are the major contributors to the pool of cells with integrated HIV DNA in lymph nodes from long-term suppressed individuals. A) Integrated DNA measurements obtained in total CD4 T cells from the blood and sorted CD4 T cell subsets from lymph nodes in n=5 long-term suppressed individuals. Undetectable measurements are represented by opened symbols and limits of detection are plotted. B) Contribution of the subsets to the pool of cells with integrated HIV DNA in the lymph nodes from n=5 long-term suppressed individuals. For statistical analyses, non-parametric Wilcoxon tests were used.

Chapitre 5 : Discussion et perspectives

L'incapacité du traitement antirétroviral à éliminer complètement le VIH souligne l'importance de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques visant à éliminer les réservoirs viraux. La mise au point de telles stratégies nécessite une meilleure compréhension des mécanismes de persistance virale au sein des réservoirs anatomiques et cellulaires, ainsi que des phénotypes des cellules dans lesquelles le virus persiste chez les individus sous thérapie antirétrovirale. Le développement du HIV-Flow a grandement facilité l'étude du phénotype des cellules réservoirs [289]. Ci-dessous, nous discutons les avantages et les inconvénients de cette technique ainsi que les perspectives qu'elle ouvre.

HIV-Flow : un outil pour identifier de nouvelles molécules préférentiellement exprimées par les cellules p24+ chez les individus traités et non traités.

Grâce à ce nouvel outil, nous avons identifié plusieurs molécules préférentiellement exprimées à la surface des cellules réservoirs chez les individus vivant avec le VIH qu'ils soient traités ou non par ART [289]. Parmi ces molécules, citons les intégrines $\alpha 4\beta 7$ et $\alpha 4\beta 1$, qui promeuvent la migration des cellules vers divers sites anatomiques via la reconnaissance de leur ligand exprimé à la surface des cellules endothéliales [381]. L'intégrine $\alpha 4\beta 7$ permet la migration des lymphocytes circulants vers l'intestin via la reconnaissance du ligand MAdCAM (*Mucosal Addressin Cell Adhesion Molecule*), tandis que $\alpha 4\beta 1$ favorise la migration vers les tissus périphériques dans des conditions d'inflammation via la reconnaissance du ligand VCAM-1 (*Vascular cell adhesion protein 1*) [381].

Nous avons en effet montré par HIV-Flow que l'intégrine $\alpha 4\beta 7$ est préférentiellement exprimée à la surface des cellules p24+ chez les individus non traités. Cette observation est à mettre en parallèle avec plusieurs résultats cités dans la littérature. 1) En 2008, il a été montré que l'enveloppe virale gp120 est capable de lier la forme activée de $\alpha 4\beta 7$ [382]. Cette interaction à la surface des cellules T CD4+ faciliterait la formation de synapses virologiques et par conséquent la propagation de l'infection entre cellules. 2) De plus, les cellules exprimant de hauts niveaux de l'intégrine $\alpha 4\beta 7$ expriment également de hauts niveaux du co-récepteur CCR5 et sont hautement susceptibles à l'infection par le VIH comparativement aux cellules exprimant de faibles niveaux de cette intégrine [383]. 3) Par ailleurs, les cellules CD4+ $\alpha 4\beta 7+$ sont déplétées très rapidement au cours de l'infection par le VIH, particulièrement dans l'intestin [384]. En outre, la thérapie antirétrovirale ne permet pas de restaurer la fréquence de ces cellules à des niveaux similaires à ceux observés chez les individus non infectés, même lorsque ART est initiée très rapidement [384]. 4) Finalement, il a été montré récemment que l'interaction entre MadCAM et $\alpha 4\beta 7$ promeut la réplication virale du VIH [385]. A l'inverse, le rôle de $\alpha 4\beta 7$ dans la persistance

du VIH chez les individus sous ART a été très peu étudié. En utilisant le HIV-Flow, nous avons montré que cette intégrine ne semble pas constituer un marqueur de réservoir viral dans le sang périphérique des individus sous ART. Cette observation n'exclut pas la possibilité que l'intégrine $\alpha 4\beta 7$ soit préférentiellement exprimée par les lymphocytes T CD4+ de l'intestin chez ces individus. Puisque le HIV-Flow requiert de relativement faibles quantités de cellules T CD4+, il serait donc intéressant d'utiliser cet outil sur des biopsies intestinales pour tester cette hypothèse.

Grâce au HIV-Flow, nous avons identifié pour la première fois l'intégrine $\alpha 4\beta 1$ comme étant préférentiellement exprimée par les cellules p24+ du sang périphérique à la fois chez les individus non traités, mais également chez les individus sous ART. Dans une affiche présentée à la CROI 2019 (*Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections*), une équipe a également rapporté l'expression préférentielle de cette intégrine par les cellules latentes du sang périphérique chez les individus sous ART, via l'utilisation du CyTOF (*Mass Cytometry*) [386]. Cette nouvelle technique représente une version alternative de cytométrie en flux dans laquelle les anticorps sont marqués avec des métaux lourds plutôt que des fluorochromes, permettant d'analyser près de 40 paramètres simultanément à l'échelle d'une cellule unique. L'introduction de cette technologie dans le domaine du VIH constitue une avancée majeure, qui s'ajoute aux méthodes de RNA-Flow FISH et de HIV-Flow pour aider à une meilleure compréhension du phénotype des cellules réservoirs. Des études complémentaires devraient permettre de déterminer si les cellules $\alpha 4\beta 1+$ sont également enrichies en virus compétent pour la réplication. Tout comme pour l'intégrine $\alpha 4\beta 7$, il est possible que les cellules exprimant l'intégrine $\alpha 4\beta 1$ présentent une susceptibilité accrue à l'infection par le VIH. Bien que des études initiales suggèrent que la protéine gp120 se lie de façon minimale à l'intégrine $\alpha 4\beta 1$, des études complémentaires seront nécessaires pour déterminer si les cellules $\alpha 4\beta 1+$ expriment de hauts niveaux du co-récepteur CCR5. Il est également probable que l'intégrine $\alpha 4\beta 1$ favorise la survie cellulaire et par conséquent la persistance à long terme des cellules infectées exprimant cette intégrine. Dans le sens de cette hypothèse, une étude publiée en 2012 a montré que la protéine CD37 induit le regroupement des intégrines $\alpha 4\beta 1$ à la surface des cellules B, favorisant l'activation subséquente de la voie PI3K/Akt qui est impliquée dans la survie cellulaire [387]. Finalement, il serait intéressant de comprendre pourquoi l'intégrine $\alpha 4\beta 1$ représente un marqueur de réservoir viral dans le sang périphérique des individus traités, contrairement à $\alpha 4\beta 7$. La dynamique de migration et de recirculation des cellules exprimant ces intégrines pourrait entre autres expliquer cette observation. MAdCAM (ligand de $\alpha 4\beta 7$) est exprimé de façon **constitutive** à la surface des cellules endothéliales de l'intestin [388]. De plus, une étude publiée en 2010 suggère que les cellules T CD8+ effectrices, après avoir migré au niveau de la muqueuse intestinale, se différencient en cellules T CD8+ mémoires et deviennent des cellules résidentes du tissu [389].

La migration continue des cellules T CD4⁺ vers l'intestin et l'absence de recirculation de ces cellules dans le sang périphérique pourraient expliquer pourquoi $\alpha 4\beta 7$ ne représente pas un marqueur de cellules réservoirs dans le sang. A l'inverse, VCAM-1 (ligand de $\alpha 4\beta 1$) n'est exprimé à la surface des vaisseaux que **dans des conditions d'inflammation** en réponse à certaines cytokines (IL-1, TNF, etc) [390]. Puisque l'introduction de ART est associée à une réduction du contexte inflammatoire et de l'activation immune [391], il est possible d'envisager que la régulation négative de VCAM-1 soit associée à une diminution du recrutement des lymphocytes mémoires $\alpha 4\beta 1+$ vers les tissus, ce qui favoriserait le maintien d'un réservoir viral exprimant $\alpha 4\beta 1$ dans le sang périphérique.

La mise en évidence du rôle de ces intégrines dans la réplication virale et la persistance à long-terme du VIH ouvre de nouvelles avenues thérapeutiques. Au cours de la dernière décennie, plusieurs études se sont focalisées sur l'utilisation d'un anticorps bloquant anti- $\alpha 4\beta 7$ dans des modèles de primates non humains SIV⁺ (discuté dans [392]). Cet anti- $\alpha 4\beta 7$ (Vedolizumab), déjà utilisé dans le cadre du traitement des maladies inflammatoires de l'intestin [393], réduit la migration des lymphocytes T CD4⁺ $\alpha 4\beta 7+$ vers l'intestin en bloquant leur interaction avec MAdCAM, limitant les dommages tissulaires liés à l'inflammation. Une étude publiée en 2018 a étudié les effets immunologiques et virologiques de l'administration du vedolizumab chez des individus VIH⁺ atteints de maladies inflammatoires de l'intestin [394]. Cette étude rapporte une diminution des agrégats lymphoïdes suite à la thérapie anti- $\alpha 4\beta 7$, parallèlement à une augmentation des lymphocytes T CD4⁺ mémoires $\beta 7^{\text{high}}$ dans la circulation. De plus, l'administration du vedolizumab est associée à une activation des cellules NK, suggérant la capacité de cette thérapie à améliorer le contrôle de l'infection. Une diminution de l'ADN viral a également été détectée chez 2/5 participants au niveau du sang périphérique, et chez 3/5 participants dans le tractus gastro-intestinal. Bien que ces diverses études suggèrent les effets prometteurs de cette intervention (diminution de la charge virale plasmatique et des niveaux d'ADN proviral dans l'intestin ainsi qu'un contrôle de la virémie après interruption de ART dans les modèles primates non humains, diminution des agrégats lymphoïdes chez l'humain), des études plus récentes effectuées chez des macaques infectés par le SIV [395] et chez des individus VIH⁺ sous ART (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT02788175) [396] n'ont pas pu observer les effets bénéfiques de cette thérapie. Plusieurs facteurs pourraient expliquer cette observation : le type d'anti- $\alpha 4\beta 7$ utilisé, le virus utilisé pour infecter les singes, la façon dont l'essai clinique a été mené ou par des différences physiologiques entre l'humain et les macaques. Puisque l'acide rétinolique (métabolite de la vitamine A) est connu pour induire l'expression de $\alpha 4\beta 7$ sur les cellules T [397], l'inhibition de cette voie semble être une alternative à explorer en clinique. Citons entre autres le

1,25 dihydroxy-VitD3 (métabolite actif de la vitamine D), connu pour inhiber l'expression de $\alpha 4\beta 7$ induite par l'acide rétinoïque [398].

Par ailleurs, l'identification de $\alpha 4\beta 1$ comme marqueur de réservoir viral chez les individus infectés ouvre également de nouvelles perspectives de traitement. En effet, le blocage de cette molécule limite la migration des cellules T CD4+ $\alpha 4\beta 1+$ vers les tissus enflammés [399], et pourrait par conséquent limiter l'inflammation et le développement de sanctuaires anatomiques du VIH-1 au niveau de divers sites anatomiques (e.g. cerveau, moelle osseuse, organes lymphoïdes). Le Natalizumab est un anti- $\alpha 4$, approuvé pour le traitement de la sclérose en plaques et de la maladie de Crohn [400, 401]. Néanmoins, l'administration de cet anticorps est associée à un risque de leucoencéphalopathie multifocale (PML) suite à la réactivation du virus de John Cunningham (JC), qui se trouve sous forme latente chez la majorité des adultes [402]. Par conséquent, ce traitement semble peu conseillé dans le cadre d'individus infectés par le VIH qui ont un système immunitaire affaibli. Le développement de nouveaux anticorps anti- $\alpha 4$ présentant moins d'effets secondaires semble donc d'un intérêt particulier.

Une étude publiée en 2016 par notre laboratoire montre que les sous-populations cellulaires exprimant PD-1, TIGIT et LAG-3 contiennent de plus hauts niveaux d'ADN intégré que les sous-populations n'exprimant pas ces molécules co-inhibitrices chez les individus sous ART [288]. En utilisant le HIV-Flow, nous avons montré que les sous-populations exprimant PD-1 et TIGIT sont enrichies en provirus compétents pour la traduction protéique [289]. Toutefois, nous n'avons pas observé d'enrichissement en cellules p24+ dans la sous-population exprimant LAG-3. Par ailleurs, Fromentin *et al* ont également montré que la co-expression de PD-1, LAG-3 et TIGIT à la surface des cellules CD4 augmente le degré d'enrichissement en ADN viral [288]. Dans ce sens, la co-expression de PD-1, TIGIT et $\alpha 4\beta 1$ à la surface des cellules augmente le degré d'enrichissement en virus compétents pour la traduction protéique par rapport à la population globale de lymphocytes T CD4 [289]. Néanmoins, il est intéressant de constater que ce degré d'enrichissement n'est augmenté que de 4,4X, suggérant que la co-expression de ces marqueurs ne permet d'augmenter le degré d'enrichissement que de façon minimale. Cette observation indique que les cellules p24+ expriment des combinaisons variables de marqueurs d'enrichissement et qu'il n'existe pas une combinaison unique de marqueurs de surface permettant d'enrichir de façon importante en virus compétents pour la traduction protéique.

Dans notre étude réalisée sur les ganglions lymphatiques, nous avons également montré que les cellules PD-1+ sont légèrement enrichies en ADN intégré par rapport aux cellules PD-1- chez des individus sous thérapie antirétrovirale depuis plus de 8 ans (chapitre 4). Toutefois, cette

sous-population PD-1+ contient une plus faible proportion de cellules produisant des ARN tat/rev après stimulation que les cellules PD-1-. Cette observation suggère que les cellules PD-1+ des ganglions lymphatiques contiennent une haute fraction de virus défectifs incapables de produire des ARNs viraux après stimulation, et/ou que les virus contenus dans ces cellules sont peu inductibles. Il est possible d'envisager que l'interaction PD-1/PD-L1 à la surface des cellules PD-1+ envoie des signaux de co-inhibition favorisant l'inhibition de la réactivation virale, comme suggéré par une étude récemment publiée par notre laboratoire [290]. Nos observations sont à mettre en contexte avec une publication de 2016 qui montre que les cellules PD-1+ des ganglions lymphatiques contiennent de plus hautes fréquences de provirus compétents pour la réplication que les cellules PD-1- [88]. Néanmoins, plusieurs facteurs sont à prendre en considération. Tout d'abord, la mesure de la fréquence de cellules contenant des virus compétents pour la réplication requiert une stimulation TCR qui va induire la réactivation virale et la mise en place de nouveaux cycles d'infection. Dès lors, la haute permissivité des cellules Tfh PD-1+ à l'infection par le VIH [87] pourrait avoir un impact sur la mesure du réservoir viral observée par VOA dans cette population. De plus, cette étude a été effectuée dans une cohorte de participants traités pour une médiane de temps de 5 ans. Notre étude a été effectuée sur des participants traités depuis plus de 8 ans (médiane de temps sous ART : 12 ans). Puisque la fréquence de cellules Tfh diminue progressivement avec le temps sous traitement, il est probable que la contribution de cette population à la persistance virale soit moindre chez des individus traités depuis longtemps. Dans ce sens, une publication récente montre que les cellules CTLA-4+PD-1- des ganglions lymphatiques contiennent du virus compétent pour la réplication, et que la contribution de cette population au pool de cellules contenant de l'ADN viral augmente avec le temps sous traitement [374]. Dans ce papier, les auteurs ont utilisé la technique du DNA Scope (technique d'hybridation *in situ* permettant de détecter les cellules contenant de l'ADN viral par immunofluorescence). Cette technique présente l'avantage de préserver l'architecture des ganglions lymphatiques, permettant d'étudier la persistance virale dans divers sous-compartiments des ganglions lymphatiques. De la sorte, les auteurs ont montré que les cellules PD-1+ sont enrichies en ADN viral dans les follicules B, tandis que dans les zones extrafolliculaires, la majorité de l'ADN viral se retrouve dans les cellules CTLA-4+PD-1-. Malheureusement, nos études ne permettent pas de préserver l'architecture tissulaire et de faire la distinction entre les zones folliculaires et extrafolliculaires.

Comme mentionné ci-dessus, certaines études suggèrent que les cellules CTLA-4+ sont enrichies en ADN viral et en virus compétents pour la réplication [374]. Nous n'avons malheureusement pas pu déterminer par HIV-Flow si les cellules CTLA-4+ du sang périphérique sont enrichies en virus compétent pour la traduction protéique. En effet, bien que CTLA-4 soit exprimé à la surface cellulaire et exerce ses fonctions de régulation négative via son interaction avec ses ligands CD80 et CD86, CTLA-4 est principalement localisé dans des vésicules

endosomales et circule de façon continue entre la surface cellulaire et ces vésicules intracellulaires [403]. Dès lors, l'étude des niveaux d'expression de la molécule CTLA-4 par cytométrie en flux implique une étape de perméabilisation cellulaire. La visualisation des cellules p24+ par HIV-Flow chez les individus sous ART requiert une stimulation cellulaire par la PMA/ionomycine, qui augmente de façon considérable les niveaux intracellulaires de CTLA-4 (données non montrées). Dès lors, il est impossible d'étudier le phénotype initial des cellules p24+ sous ART (avant stimulation) en termes d'expression de CTLA-4 en utilisant notre technique.

Bien qu'une étude publiée en 2016 suggère que la molécule CD32 est préférentiellement exprimée à la surface des cellules contenant des provirus compétents pour la réplication [366], ces résultats sont controversés [365, 367-371, 372]. Afin d'étudier l'implication de la molécule CD32 dans la persistance à long-terme du VIH, nous avons utilisé le HIV-Flow pour déterminer si les cellules CD32^{high} sont enrichies en virus compétent pour la production protéique [289]. Puisque certaines études suggèrent que les kits d'enrichissement CD4 par sélection négative éliminent la majorité des cellules T CD4+CD32+ [404], nous avons réalisé le HIV-Flow sur les PBMCs totaux plutôt que d'effectuer une étape préalable d'enrichissement en cellules CD4. Nos résultats montrent que toutes les cellules infectées de manière latente sont CD32^{neg}, et ce pour les 4 participants sous ART [289]. Il est également probable que le processus de décongélation cellulaire entraîne une certaine dégradation de la molécule CD32 à la surface des cellules T CD4, ce qui pourrait éventuellement expliquer pourquoi nous n'avons pas observé d'enrichissement en virus compétents pour la traduction dans la population de cellules CD32^{high}. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons purifié par cytométrie en flux les sous populations CD32^{high} et CD32^{low} à partir des PBMCs de sang frais d'un patient sous ART, et avons mesuré par PCR les niveaux d'ADN viral dans ces deux sous-populations. Aucun enrichissement en ADN viral n'a pu être détecté dans la population de cellules CD32^{high} (données non montrées). Des études complémentaires seront nécessaires pour expliquer ces résultats controversés.

HIV-Flow : un outil pour mesurer la capacité des LRAs à réactiver le VIH de sa latence.

Via l'utilisation du HIV-Flow, nous avons étudié la capacité de divers LRAs à réactiver le virus de sa latence dans les CD4 totaux ainsi que dans les sous-populations de lymphocytes T CD4+ mémoires. Nous avons montré que les inhibiteurs d'histones désacétylases (panobinostat et romidepsine) ainsi que l'inducteur de P-TEFb JQ-1 ont un effet limité ou pas d'effet sur la réactivation virale (chapitre 3). L'agoniste de PKC ingénol présente une capacité légèrement plus élevée à induire la production virale, avec un pourcentage de réactivation d'environ 18% comparativement à la réactivation induite par la PMA/ionomycine. Comme attendu, les combinaisons d'un HDACi avec l'ingénol réactivent l'expression virale de façon plus efficace que les LRAs seuls. Cette observation est en accord avec plusieurs études *ex vivo* montrant que les

combinaisons d'agents anti-latence ont une capacité plus élevée que les LRAs seuls à réactiver le virus de sa latence [301, 305, 306, 307, 308]. De façon intéressante, malgré les hautes doses de LRAs utilisées dans notre étude, les combinaisons testées ont une capacité relativement limitée à induire la production virale comparativement à la PMA/ionomycine, avec un pourcentage de réactivation de seulement 30%. En parallèle, nous avons également étudié la capacité de ces combinaisons à induire l'expression de divers transcrits viraux (Johann Plantin, données non publiées). Lorsque les LRAs sont combinés, les niveaux de transcrits R (initiation de l'élongation) sont similaires à ceux obtenus par la stimulation PMA/ionomycine, tandis que les niveaux des autres transcrits (Pol : élongation distale ; PolyA : transcrits matures polyadénylés ; Tat/rev : transcrits multi-épissés) sont inférieurs à ceux obtenus par la PMA/ionomycine. Ce résultat indique que ces combinaisons restent sous-optimales dans leur capacité à induire l'élongation distale, la maturation et l'épissage des transcrits. De plus, les pourcentages de réactivation observés pour les transcrits Pol, PolyA et Tat/rev dans ces conditions de combinaisons sont supérieurs aux pourcentages de réactivation observés en HIV-Flow (environ 50% de la réactivation PMA/ionomycine pour chacun de ces transcrits versus 30% de la réactivation PMA/ionomycine en HIV-Flow), suggérant qu'il existe potentiellement des blocs à la traduction protéique. Des études complémentaires sont nécessaires pour identifier les facteurs responsables de ce blocage traductionnel. Plusieurs hypothèses peuvent être envisagées : 1) Présence de mi-RNA cellulaires qui ciblent les ARNs viraux ; 2) Restriction en acides aminés indispensables pour la traduction protéique ; 3) Restriction en facteurs d'initiation de la traduction. En conclusion, l'incapacité de ces combinaisons à réactiver l'ensemble des réservoirs viraux, et ce même à des doses extrêmement élevées qui ne pourront pas être utilisées en clinique, remet en question l'efficacité de la stratégie du *Shock and Kill* pour atteindre une guérison fonctionnelle. De plus, comme discuté ci-dessous, la multiplicité des sanctuaires anatomiques [69] et des sous-populations cellulaires dans lesquelles le virus persiste [156] complique la mise en place d'une stratégie de *Shock and Kill* capable de réactiver le virus dans chaque sous-population simultanément. Enfin, l'élimination complète des réservoirs viraux requiert une pénétration optimale des agents anti-latence dans tous les sanctuaires anatomiques dans lesquels le virus persiste, ainsi qu'une pénétration optimale des ARVs dans ces sites anatomiques pour éviter de nouveaux cycles d'infection au moment de la réactivation virale. La capacité du système immunitaire à éliminer les cellules infectées suite à la réactivation virale est également une problématique importante, qui est discutée dans l'introduction.

Nous avons également montré que plusieurs facteurs cellulaires impliqués dans la latence virale sont exprimés à différents niveaux par les sous-populations de lymphocytes T CD4+ mémoires, et que les agents anti-latence induisent des réponses pharmacologiques distinctes au sein des T_{CM}, T_{TM} et T_{EM}. Ces observations illustrent l'importance de tenir compte de

l'hétérogénéité des réservoirs viraux dans lesquels le virus peut persister chez les individus sous ART. Le HIV-Flow offre l'opportunité d'étudier la capacité des LRAs à réactiver la production virale dans les différentes sous-populations de lymphocytes T CD4+ mémoires par un protocole classique de cytométrie en flux. Grâce à cette technique, nous avons pu montrer que l'agoniste de PKC ingénoïl a des effets modestes et similaires entre les 3 sous-populations de lymphocytes T CD4+ mémoires (T_{CM} , T_{TM} et T_{EM}). Il est intéressant de constater que la combinaison d'un agoniste de PKC avec un inhibiteur de HDAC réactive la production virale à des niveaux similaires à ceux induits par la PMA/ionomycine dans les T_{CM} . Néanmoins, dans les T_{TM} et T_{EM} , cette combinaison n'est pas aussi efficace que la PMA/ionomycine pour réactiver la production virale, mettant en évidence l'importance d'identifier des combinaisons de LRAs qui permettraient de réactiver efficacement le virus dans toutes les sous-populations. Dans ce contexte, il serait intéressant d'étudier si l'ajout de la γ -cytokine IL-15 à cette combinaison (agoniste de PKC + HDACi) améliore la réactivation virale. En effet, l'IL-15 ainsi qu'un superagoniste de cette cytokine (ALT-803) favorisent la réactivation virale dans des modèles cellulaires de latence ainsi que dans des cellules isolées d'individus sous ART [405]. L'ALT-803 est un composé à l'essai dans plusieurs études cliniques pour le traitement de tumeurs solides et hématologiques, et possède une durée de demi-vie plus élevée (25h vs <40min) ainsi qu'une activité biologique plus élevée (>25 fois plus actif) que l'IL-15 [406]. Il est à noter que dans un modèle de macaques infectés par le SIV, ce superagoniste ne semble pas avoir d'effet sur la production virale [407]. Toutefois, l'ALT-803 est également à l'essai dans une étude clinique de phase I (NCT02191098) chez des individus VIH+ sous ART, et les résultats préliminaires montrent que cet agent favorise l'induction de la transcription virale [408]. Par ailleurs, l'IL-15 serait non seulement capable d'induire la réactivation virale (« Shock ») mais pourrait également jouer un rôle important dans l'élimination des cellules infectées (« Kill »). En effet, l'IL-15 favorise l'activation et la prolifération de populations immunes innées et adaptatives, particulièrement les cellules *Natural Killer* (NK) et les cellules T CD8+ [409]. Dans l'essai clinique de phase I mentionné ci-dessus, l'ALT-803 induit l'activation et la prolifération des cellules T CD4+, CD8+ et des cellules NK. De plus, l'ALT-803 active et redirige les cellules T CD8+ spécifiques du VIH depuis le sang vers les follicules B des ganglions lymphatiques [410], un site anatomique immunoprivilégié pour la persistance du VIH [96]. Enfin, l'ALT-803 augmente la reconnaissance et l'élimination des cellules T CD4+ infectées isolées d'individus sous ART par les cellules T CD8+ spécifiques autologues [405]. Des études complémentaires sont nécessaires pour déterminer les facteurs responsables de cette augmentation de l'élimination des cellules infectées par l'ALT-803. D'une part, il est possible que cet agent, via son action de LRA, augmente la présentation à la surface des cellules T CD4 infectées. Par ailleurs, une étude publiée en 2003 montre que l'IL-15 augmente la survie des

cellules T CD8+ spécifiques du VIH, ainsi que leurs fonctions (*i.e.* augmentation de leur activation, de leur production d'IFN-gamma, et de leur cytotoxicité) [411].

Le HIV-Flow semble également un outil de choix pour étudier la persistance virale au sein de sous-populations fonctionnelles (Th1, Th2, Th17, etc). Cependant, la plupart des marqueurs de surface définissant ces populations sont perdus ou au contraire davantage exprimés après stimulation par la PMA/ionomycine. Dans le chapitre 2, nous avons montré que l'usage de la brefeldine A, un agent responsable de l'inhibition du transport entre le réticulum endoplasmique et le Golgi, permet d'empêcher l'augmentation de l'expression de plusieurs marqueurs de surface suite à la stimulation [289]. Néanmoins, la brefeldine A n'a pas d'action sur les marqueurs dont l'expression est diminuée par la stimulation, ce qui est le cas de la plupart des marqueurs de surface définissant les sous-populations fonctionnelles (CD25, CD127, CXCR5, CXCR3, CCR4, CCR6). Dans le cadre de cette étude, nous avons testé plusieurs inhibiteurs d'endocytose : Iminodyn 22, Dynole 34-2, MiTMAB, OctMAB (*Dynamain Inhibitors Toolbox, Abcam, ab120468*). Malheureusement, ces inhibiteurs ne permettent pas de maintenir l'expression de ces molécules d'intérêt à la surface des cellules, soulignant l'importance d'adapter les conditions testées (concentrations des agents, cinétique d'exposition) ou d'utiliser d'autres inhibiteurs d'endocytose. La mise au point de ces conditions constitue une perspective importante pour étudier les sous-populations fonctionnelles dans lesquelles le virus persiste chez les individus VIH+ sous ART ainsi que la capacité des LRAs à réactiver le VIH dans ces différentes sous-populations.

HIV-Flow : un outil pour évaluer la fonctionnalité d'autres stratégies de guérison fonctionnelle ?

Parmi les stratégies proposées pour atteindre une guérison fonctionnelle, celle du *Block and Lock* vise à utiliser des agents pro-latence (*latency-promoting agents, LPAs*) pour bloquer la réactivation sporadique du virus latent. La capacité des LPAs à renforcer la latence virale pourrait être étudiée par HIV-Flow. En effet, si ces agents induisent un état de profonde répression transcriptionnelle, une absence de production virale devrait être observée lorsque les cellules sont exposées à une stimulation TCR ou des LRAs. Dans le cadre d'une répression incomplète, le HIV-Flow pourrait être utilisé pour déterminer si les LPAs inhibent préférentiellement la production virale dans certaines sous-populations cellulaires plutôt que dans d'autres. Dans ce cadre, il serait envisageable d'identifier une combinaison de LPAs qui inhibe efficacement l'expression virale dans toutes les sous-populations.

L'évaluation de l'efficacité des stratégies visant à diminuer la taille des réservoirs viraux requiert la mise au point de méthodes qui permettent de mesurer la taille des réservoirs avec précision, avant et après introduction du traitement. Dans la majorité de ces études cliniques, la

taille du réservoir viral est évaluée en utilisant des méthodes PCR spécifiques de l'ADN du VIH, qui ne permettent pas de faire la distinction entre les génomes proviraux intacts ou défectifs. Par conséquent, une diminution de la taille des réservoirs viraux pourrait être observée par PCR en l'absence d'une diminution de la fréquence de cellules contenant des virus compétents pour la réplication, comme démontré récemment dans une étude menée par Huang *et al* [342]. Il est également possible de ne pas observer de diminution de la taille du réservoir viral par PCR alors qu'il existe une diminution de la fréquence de cellules contenant des provirus intacts [190]. Ceci illustre l'importance d'utiliser des méthodes capables d'identifier les réservoirs viraux compétents pour la réplication. Le QVOA permet de répondre à cette question, mais cette méthode est coûteuse, laborieuse, et requiert de grandes quantités de cellules [63, 65, 66, 347]. Le HIV-Flow pourrait représenter une méthode alternative, puisque cette approche est rapide (2 jours), facile (protocole classique de cytométrie en flux) et requiert un nombre relativement faible de cellules T CD4+ (5-10x10⁶ cellules) [289]. Cette approche présente l'avantage de mesurer l'inductibilité des provirus, et fournit une mesure plus précise de la taille du réservoir viral que les méthodes PCR ADN ou ARN. En effet, le HIV-Flow permet de déterminer la fréquence de cellules infectées capables de produire des protéines virales correctement repliées, limitant la détection de cellules contenant des provirus défectifs. Toutefois, toutes les cellules p24+ ne contiennent pas nécessairement un virus compétent pour la réplication, puisque certains provirus défectifs peuvent quand même être transcrits et traduits [213]. Des études en cours dans le laboratoire permettront de déterminer la proportion de cellules p24+ qui contiennent des génomes intacts et potentiellement compétents pour la réplication. Récemment, l'équipe de Robert Siliciano a développé un nouvel essai de PCR ADN permettant de distinguer les formes intacts des formes défectives (*Intact Proviral DNA Assay*, IPDA) [396]. Cette méthode, en mesurant la fréquence de cellules contenant un provirus intact, présente un intérêt particulier pour évaluer l'efficacité des interventions cliniques. Néanmoins, cette méthode présente l'inconvénient de ne pas mesurer l'inductibilité de ces génomes intacts. En effet, il est probable que certains de ces génomes intacts ne soient pas inductibles (*e.g.* site d'intégration dans une zone de répression transcriptionnelle, environnement cellulaire) de sorte qu'ils ne participeront pas au rebond viral observé après interruption du traitement. Dans ce sens, une récente étude a étudié le profil transcriptionnel des cellules infectées de manière latente dans un modèle de latence virale [412]. Les auteurs ont identifié deux sous-populations cellulaires ayant des profils transcriptionnels différents et des capacités de réactivation variées à la stimulation TCR. Ces observations suggèrent qu'il existe deux sous-populations hétérogènes de cellules infectées, l'une se trouvant dans un état de latence profonde et ne répondant pas aux signaux de stimulation, tandis que l'autre présente un état de latence plus superficielle et est réactivée de façon efficace par la stimulation.

HIV-Flow : un outil pour caractériser les cellules p24+ dans divers tissus

En collaboration avec l'université de San Francisco (UCSF), nous avons eu accès à des ganglions lymphatiques complets ainsi qu'à des prélèvements cellulaires de ganglions lymphatiques inguinaux (*Fine Needle Aspirations*, FNA) provenant d'individus traités ou non (voir chapitre 4). Dans notre étude, nous avons montré que les niveaux de transcription active dans les ganglions lymphatiques sont significativement plus élevés que dans le sang (chapitre 4). Par ailleurs, les fréquences de cellules exprimant des ARN multi-épissés tat/rev ne diffèrent pas significativement avant et après stimulation, suggérant que la majorité des cellules CD4 des ganglions lymphatiques sont transcriptionnellement actives. Dans ce sens, plusieurs études ont rapporté la persistance de cellules ARN+ sous traitement dans le cadre de l'infection par le SIV/VIH [88-91]. Cependant, nous n'avons pas détecté de production active de protéines p24 par HIV-Flow dans les FNA d'individus sous ART. Cette absence de détection pourrait s'expliquer par l'absence de traduction protéique dans les ganglions lymphatiques d'individus sous ART et/ou par le relativement faible nombre de cellules T obtenues dans le contexte des FNA. Dès lors, nous prévoyons de répéter les expériences de HIV-Flow sur des biopsies complètes de ganglions lymphatiques, afin d'augmenter la probabilité d'observer une production virale résiduelle dans les ganglions lymphatiques.

Le HIV-Flow présente également l'avantage de permettre la caractérisation phénotypique des cellules p24+ dans les ganglions lymphatiques. Dans ce contexte, nous avons étudié le rôle de la molécule ICOS (*Inducible T-cell COStimulator*) dans la persistance du VIH (Annexe 1). ICOS est une molécule de co-stimulation exprimée à la surface des cellules T activées, tandis que son ligand ICOSL est exprimé exclusivement à la surface des cellules présentatrices d'antigènes. Puisque plusieurs études ont montré que la molécule ICOS joue un rôle pro-survie, nous avons émis l'hypothèse que les cellules infectées exprimant cette molécule présenteraient un avantage de survie sélectif. En effet, l'interaction entre ICOS et son ligand est associée à une forte activation de la voie pro-survie PI3K/Akt dans les lymphocytes T [413]. Par ailleurs, la stimulation ICOS/ICOSL induit une augmentation de l'expression de la molécule anti-apoptotique Bcl2 dans les cellules lymphoïdes innées de type 2 (ILC2s), favorisant leur survie [414]. Nous avons montré que la molécule ICOS est préférentiellement exprimée par les cellules p24+ productivement infectées chez les individus virémiques, à la fois dans le sang et dans les ganglions lymphatiques. Puisque l'activation des cellules T est requise pour l'infection productive [415], et que l'expression d'ICOS est augmentée en réponse à l'activation cellulaire [416], il n'est pas surprenant d'observer ce phénotype. Néanmoins, dans le sang périphérique des individus avirémiques, les cellules infectées de manière latente ne semblent pas exprimer ICOS, ce qui va à l'encontre de notre hypothèse initiale. Dans les FNA des individus avirémiques, l'absence de détection de cellules p24+ ne nous permet pas d'émettre des conclusions sur le phénotype des cellules infectées dans

les ganglions lymphatiques. S'il existe une production active résiduelle dans les ganglions lymphatiques d'individus sous ART, des études supplémentaires sur ganglions lymphatiques complets devraient potentiellement nous permettre de détecter des cellules p24+ par HIV-Flow. Puisque l'interaction ICOS/ICOSL favorise l'activation de voies de signalisation impliquées dans l'activation transcriptionnelle du provirus (PI3K/Akt, NF- κ B) [233, 413, 417, 418], et suite à une haute proximité cellulaire dans les ganglions lymphatiques augmentant la probabilité d'interaction ICOS/ICOSL, nous émettons l'hypothèse que ces cellules p24+ productivement infectées seront enrichies dans la population ICOS+.

Un autre compartiment qui pourrait constituer un réservoir anatomique préférentiel chez les individus VIH+ sous traitement est la moelle osseuse [77, 79, 80, 419]. En effet, la moelle osseuse est un site privilégié pour la persistance des cellules T mémoires. Le HIV-Flow devrait nous permettre de déterminer si, dans la moelle osseuse, le virus persiste par production active (détection de cellules p24+ en l'absence de stimulation), et/ou par latence (détection de cellules p24+ après stimulation par la PMA/ionomycine). Cet essai nous permettra également d'étudier les types cellulaires (*i.e.* cellules T CD4+ mémoires et sous-populations de HSPCs) dans lesquels le virus persiste préférentiellement. Nous pourrions également étudier si les molécules identifiées comme marqueurs d'enrichissement dans le sang (PD-1, TIGIT, α 4 β 1) sont également des marqueurs de persistance dans la moelle osseuse des individus sous ART.

Enfin, nous avons entamé une collaboration avec le Thai Red Cross (Bangkok, Thaïlande) afin de démontrer la fonctionnalité du HIV-Flow pour caractériser le réservoir dans des biopsies intestinales provenant d'individus vivant avec le VIH en Thaïlande (sous-type CRF01 AE). Cet essai sera d'abord testé sur des échantillons biologiques de participants non traités. Si ces essais s'avèrent fonctionnels, il serait intéressant de déterminer si le HIV-Flow peut être utilisé dans le contexte de biopsies intestinales provenant d'individus sous traitement. Une pénétration sous-optimale des agents antirétroviraux au niveau du tissu lymphoïde intestinal [90], ainsi que l'expression de pompes à efflux par les cellules Th17 [420] favorisant l'export actif des agents antirétroviraux, pourraient favoriser une production active résiduelle au niveau de ce site anatomique. Si tel est le cas, le HIV-Flow devrait permettre la détection de cellules p24+ en l'absence de stimulation par la PMA/ionomycine. D'autre part, les cellules T CD4+ CCR6+ du colon sont enrichies en ADN viral chez les individus sous ART [169], et expriment de plus hauts niveaux de CCR5, β 7 et phospho-mTOR que les cellules CCR6- [421]. Il serait dès lors intéressant de déterminer par HIV-Flow si ces cellules CCR6+ du colon constituent des réservoirs compétents pour la traduction protéique. Par ailleurs, nous avons précédemment montré grâce au HIV-Flow que l'intégrine α 4 β 7, impliquée dans la migration des lymphocytes T vers l'intestin, ne semble pas

représenter un marqueur de réservoir viral dans le sang périphérique des individus sous ART. Cette observation n'exclut pas la possibilité que l'intégrine $\alpha 4\beta 7$ soit préférentiellement exprimée par les cellules p24+ de l'intestin chez ces individus. Il est à noter qu'une étude publiée en 2010 suggère que les cellules T CD8+ effectrices, après avoir migré au niveau de la muqueuse intestinale, se différencient en cellules T CD8+ mémoires et réduisent leur niveau d'expression de $\alpha 4\beta 7$ [389]. Dans le cas où cette même dynamique existe pour les lymphocytes T CD4+, il est possible que les cellules p24+ de l'intestin ne montrent pas d'expression préférentielle de $\alpha 4\beta 7$.

HIV-Flow : quelles perspectives ?

Une première perspective vise à déterminer la proportion de génomes proviraux intacts au sein de la population de cellules p24+. Pour ce faire, nous sommes en train de développer une version modifiée du *Full-Length Individual Proviral Sequencing Assay* (FLIPS) [422], qui vise à amplifier et séquencer le génome presque complet des provirus ($\approx 9\text{kb}$) à l'échelle de la cellule individuelle. Des résultats préliminaires suggèrent qu'environ 25% des cellules p24+ contiennent un génome intact, indiquant qu'une certaine proportion des génomes défectifs sont capables de produire des protéines virales. Ces résultats sont en accord avec une étude publiée par Pollack *et al* en 2017, montrant que les génomes défectifs peuvent être transcrits/traduits et reconnus par les lymphocytes T CD8+ cytotoxiques [213]. Par ailleurs, notre méthode permet d'enregistrer le phénotype de chacune des cellules p24+ au moment où ces cellules sont triées (1 cellule par puits). Par conséquent, la séquence de chaque génome proviral peut être associée au phénotype de la cellule p24+ (e.g. sous-populations mémoires, marqueurs d'épuisement, d'activation). Cette approche devrait nous permettre de déterminer si la population de cellules p24+ contenant un génome intact présente un profil phénotypique particulier. Puisque les cellules infectées contenant un génome intact retiennent le potentiel de produire des composantes virales, l'expression de facteurs cellulaires réprimant l'expression virale pourrait constituer un avantage pour la persistance de ces génomes intacts (e.g. les récepteurs co-inhibiteurs [290], le régulateur négatif du VIH *IFI16* (*interferon gamma inducible protein 16*) qui inhibe la transcription virale en séquestrant le facteur de transcription *Sp1* [423], les enzymes épigénétiques qui promeuvent la latence virale).

Une deuxième perspective vise à utiliser le HIV-Flow pour étudier la fréquence de cellules p24+ et le phénotype de ces cellules dans une étude longitudinale (n=6 participants sous ART) afin de déterminer si le phénotype des cellules infectées évolue avant et après traitement et s'il évolue au cours du temps sous ART. Pour chacun des participants, nous disposons de PBMCs prélevés à différents moments, à la fois au cours de la phase d'infection non traitée et après introduction de ART. Le CRCHUM a récemment fait l'acquisition d'un *FACSymphony* (BD), qui

permet d'analyser près de 30 paramètres simultanément. Ceci devrait nous permettre d'analyser de façon extensive le phénotype des cellules p24+ au cours du temps. Au cours de l'infection non traitée, la reconnaissance des antigènes viraux par le TCR induit l'activation et la prolifération cellulaire. Cette activation cellulaire est requise pour l'infection productive [415]. Nos résultats montrent effectivement un enrichissement en cellules productivement infectées dans les sous-populations cellulaires exprimant les marqueurs d'activation CD25 et HLA-DR [289]. L'expression de nombreuses molécules de surface est également augmentée en réponse à l'activation cellulaire, incluant les molécules de points de contrôle co-activatrices (CD28, ICOS) et co-inhibitrices (CTLA-4, PD-1, TIGIT, LAG-3, Tim3). Nous avons montré par HIV-Flow que les sous-populations exprimant ces molécules de point de contrôle sont effectivement enrichies en virus productif [289]. Puisque l'administration de ART est associée à une réduction progressive (mais incomplète) de l'activation immunitaire (*i.e.* diminution des niveaux d'antigènes viraux) [391], nous nous attendons à ce que les cellules infectées de manière latente soient enrichies dans des sous-populations cellulaires relativement différentes. Dans ce sens, nos résultats montrent que, sous ART, les cellules contenant des virus compétents pour la traduction protéique ne sont pas ou peu enrichies dans les sous-populations cellulaires exprimant des marqueurs d'activation (CD69/CD25/HLA-DR/CD38; Chapitre 3) et exprimant des molécules de co-stimulation (ICOS; Annexe 1). Néanmoins, les sous-populations cellulaires exprimant PD-1 et TIGIT sont enrichies en cellules p24+ chez les participants sous ART (Chapitre 3) [289]. L'expression de ces molécules pourrait fournir un avantage sélectif de survie pour le virus en envoyant des signaux co-inhibiteurs réprimant la réactivation virale [290]. Par ailleurs, les résultats obtenus dans nos études cross-sectionnelles suggèrent que l'intégrine $\alpha 4\beta 1$ est un marqueur de persistance virale chez les individus traités ou non, tandis que l'intégrine $\alpha 4\beta 7$ est préférentiellement exprimée par les cellules p24+ uniquement chez les individus non traités [289]. Cette différence est discutée ci-dessus. Enfin, chez les individus non traités, une plus grande proportion des cellules p24+ ont un phénotype de cellules T CD4+ centrales mémoires (environ 40%) comparativement aux individus sous ART (environ 20%) [289].

Une troisième perspective vise à étudier le transcriptome des cellules infectées chez les individus VIH+ non traités. Cette étude se fait en collaboration avec le laboratoire du Dr Daniel Douek (Vaccine Research Center, NIH, Bethesda) qui a mis au point une technique permettant d'analyser le transcriptome de cellules uniques fixées et perméabilisées. Dans ce contexte, nous avons adapté le protocole du HIV-Flow de manière à préserver les ARNs malgré les étapes de fixation et de perméabilisation. En pratique, les cellules p24+ d'un individu virémique ont été triées individuellement dans des plaques 96 puits, et ces plaques ont été envoyées à notre collaborateur qui s'occupera du séquençage ARN de ces cellules. En parallèle, nous avons enregistré le

phénotype de chacune de ces cellules p24+ à l'échelle individuelle au moment du tri (sous-populations mémoires, PD-1, HLA-I), afin de mettre en parallèle les résultats obtenus au niveau transcriptomique et protéique.

Il serait également intéressant d'étudier le profil transcriptionnel des cellules infectées de manière latente chez des individus avirémiques. Dans ce contexte, plusieurs études sont à mentionner. Une étude publiée en 2018 a utilisé l'approche du séquençage ARN à l'échelle de la cellule unique pour étudier le profil transcriptionnel des cellules infectées et non infectées dans un modèle de latence virale [424]. Dans cette étude, les auteurs ont montré que les cellules infectées de manière latente ont un profil transcriptionnel relativement similaire à celui des cellules non infectées, avec un faible nombre de transcrits différenciellement exprimés entre ces cellules infectées ou non. De plus, les cellules infectées n'exprimant pas de transcrits viraux, c'est-à-dire les cellules infectées de manière latente, présentent un profil transcriptionnel différent des cellules infectées transcriptionnellement actives. Ces observations suggèrent que le phénomène de latence virale est influencé par l'environnement transcriptionnel de la cellule. Une autre étude publiée en 2018 a développé une méthode permettant d'enrichir et d'isoler les cellules réactivées produisant la protéine d'enveloppe virale [425]. Suite à la réactivation, les cellules Env+ sont purifiées par cytométrie en flux et le transcriptome de ces cellules est comparé à celui des cellules non infectées activées. Cette méthode a permis d'identifier une série de gènes hautement exprimés dans les cellules Env+ comparativement aux cellules non infectées contrôles. Citons entre autres TIGIT, miR155 (connu pour jouer un rôle dans la latence virale via l'inhibition de l'activateur viral TRIM32 [246]), la chimiokine CCL3 (facteur suppresseur viral [426]), et le facteur de transcription Blimp-1 (connu pour réprimer la transcription virale [427]). De façon intéressante, HLA-DR est hautement exprimé par les cellules Env+ comparativement aux cellules contrôles, ce qui s'oppose à nos observations. En effet, en utilisant le HIV-Flow, nous n'avons pas observé d'enrichissement en cellules contenant des virus compétents pour la traduction protéique dans la population HLA-DR+ chez des individus sous ART (données non publiées). Enfin, l'équipe de Ya-Chi Ho a également présenté des résultats de séquençage ARN à la CROI 2019 [428]. Dans cette étude, les lymphocytes T CD4+ d'individus sous ART ont été stimulés par la PMA/ionomycine pendant 16h, et marqués par un protocole modifié de RNA Flow FISH. Les cellules p24- et p24+ ont été triées et le profil ARN de ces cellules a été établi. Grâce à cette technique, plusieurs ARN cellulaires ont été identifiés comme préférentiellement exprimés par les cellules p24+ comparativement aux cellules p24-. Cette approche est néanmoins associée à plusieurs limitations. D'une part, la nécessité de stimuler les cellules par la PMA/ionomycine afin de détecter les cellules réservoirs induit un changement important au niveau du transcriptome et protéome de ces cellules. Dès lors, cette approche ne permet pas d'analyser le transcriptome des cellules réservoirs à l'état basal. De plus, le protocole de perméabilisation associé à la technique de RNA Flow FISH est connu pour induire une dégradation importante des ARNs. Dès lors, le séquençage

ARN risque d'être fortement affecté par la faible préservation des ARNs. Par conséquent, le protocole modifié du HIV-Flow permettant de préserver les ARNs malgré les étapes de fixation/perméabilisation offre une alternative intéressante pour étudier le profil transcriptomique des cellules p24+.

Le HIV-Flow offre l'opportunité d'étudier le concept de prolifération cellulaire dans la population de cellules p24+, qui est enrichie en cellules contenant des virus compétents pour la réplication. D'une part, nous pouvons étudier les sites d'intégration au sein de cette population de cellules p24+. D'autre part, nous pouvons également amplifier et séquencer la chaîne β du TCR des cellules p24+, et ce à l'échelle de la cellule individuelle. S'il existe une expansion clonale, une grande proportion de ces cellules p24+ devrait exprimer le même TCR ou contenir des provirus intégrés au niveau du même site d'intégration. Ces deux techniques (sites d'intégration et séquençage du TCR) peuvent être combinées à la technique de FLIPS (séquençage presque complet du génome proviral), permettant d'analyser spécifiquement les séquences TCR ou les sites d'intégration dans les cellules p24+ contenant un provirus intact. Une étude menée par l'équipe de Mathias Lichterfeld a récemment développé la technique du MIP-Seq (*Matched Integration site and Proviral Sequencing*), illustrant la possibilité de combiner le séquençage du génome proviral avec la détection des sites d'intégration [429].

Les cellules immunitaires utilisent le glucose pour produire l'énergie nécessaire à la mise en place des réponses immunitaires contre les pathogènes [430]. Deux voies principales sont impliquées dans le métabolisme du glucose : la phosphorylation oxydative (OXPHOS ; voie métabolique par laquelle les cellules oxydent les nutriments pour produire de hautes quantités d'ATP), et la glycolyse (voie métabolique qui permet la conversion du glucose en pyruvate, et qui produit de plus faibles niveaux d'ATP que OXPHOS). En réponse à l'infection par le VIH, l'expression du transporteur Glut-1 est augmentée à la surface cellulaire, favorisant l'entrée du glucose dans les cellules et son métabolisme [431]. Plusieurs études ont montré que l'expression de Glut-1 est nécessaire à l'infection par le VIH [432] et que le VIH infecte préférentiellement les cellules exprimant Glut-1 [433]. Une étude publiée en 2018 a également montré que les cellules métaboliquement actives offrent des conditions favorables pour l'infection par le VIH [434]. De plus, les cellules infectées par le VIH sont métaboliquement plus actives que les cellules non infectées. Toutes ces observations pointent l'importance d'étudier le métabolisme cellulaire dans le cadre de l'infection par le VIH, chez des individus non traités ou sous thérapie antirétrovirale.

Dans le cadre de l'infection non traitée, le HIV-Flow offre une opportunité facile et rapide d'étudier l'expression de divers transporteurs du glucose ainsi que de protéines et voies de signalisations impliquées dans le métabolisme cellulaire (e.g. mTOR, CASP3, FAS, GAPDH,

GUSB) *ex vivo*, directement sur cellules de patients. En accord avec les observations précédemment obtenues [434], nous nous attendons à ce que les niveaux de ces protéines impliquées dans le métabolisme cellulaire soient plus élevés dans les cellules p24+ productivement infectées que dans les cellules p24- non infectées. De plus, l'absorption cellulaire du glucose peut être étudiée par cytométrie en flux via l'utilisation du 2-NBDG fluorescent, permettant de comparer l'absorption du glucose entre les cellules p24+ et p24- par HIV-Flow. Il a également été montré que l'inhibition partielle du métabolisme du glucose favorise la mort sélective des cellules infectées [434]. Par conséquent, il serait intéressant de déterminer par HIV-Flow si l'inhibition du métabolisme du glucose est associée à une diminution des cellules p24+ productivement infectées. La nécessité de fixer et de perméabiliser les cellules pour la visualisation des cellules p24+ par cytométrie en flux ne permet pas d'étudier l'activité métabolique des cellules (OXPHOS et glycolyse) via l'utilisation d'un analyseur de flux cellulaire. Néanmoins, une nouvelle technologie a récemment émergé, la métabolomique basée sur la spectrométrie de masse, et permet d'étudier le métabolome de cellules fixées [435]. Dès lors, il serait envisageable de trier les cellules p24+ et p24- des individus non traités et de comparer le métabolome de ces deux populations cellulaires grâce à cette technologie émergente.

Peu d'études se sont intéressées au métabolisme cellulaire des cellules infectées de manière latente chez les individus sous thérapie antirétrovirale. La nécessité de stimuler les cellules par la PMA/ionomycine pour révéler les réservoirs latents par HIV-Flow [289] complique l'étude des niveaux d'expression des protéines intracellulaires impliquées dans le métabolisme cellulaire. En effet, il est probable que la stimulation PMA/ionomycine induise une augmentation massive des niveaux de ces protéines intracellulaires, ne permettant pas d'étudier le phénotype initial des cellules infectées de manière latente. Les niveaux d'expression des transporteurs membranaires du glucose pourraient éventuellement être étudiés en présence de BFA. Des études préliminaires sont nécessaires pour déterminer si l'usage de la BFA permet d'inhiber l'augmentation des niveaux d'expression de ces transporteurs à la surface cellulaire. Il est à noter qu'une étude effectuée sur les cellules CD4 de 5 participants VIH+ sous ART n'a pas observé d'enrichissement en ADN viral dans les cellules exprimant Glut-1 comparativement aux cellules Glut-1neg [433]. Puisque la PMA est un agent anti-latence puissant qui altère fortement le phénotype des cellules, des agents réactivateurs moins agressifs pourraient éventuellement être utilisés. Dans ce sens, il a été montré que l'activation CD3, bien qu'elle augmente de façon globale l'activité métabolique des sous-populations cellulaires T CD4, maintient les programmes métaboliques distinctifs de chacune de ces sous-populations (activité métabolique et niveaux d'expression de Glut-1: $T_N < T_{CM} < T_{TM} < T_{EM}$) [434]. Dès lors, l'activation CD3 semble offrir une alternative intéressante pour étudier par HIV-Flow le phénotype métabolique des cellules p24+ chez les individus sous ART, et ce dans les différentes sous-populations de cellules CD4 mémoires. Il a également été montré que l'inhibition partielle du métabolisme du glucose dans les

cellules T CD4 d'individus sous ART bloque la réactivation virale, offrant une stratégie supplémentaire pour le *Block and Lock* du virus [434]. Cette observation pourrait être facilement confirmée par HIV-Flow. De façon intéressante, les cellules Tfh, qui sont des réservoirs cellulaires de prédilection pour la persistance à long-terme du VIH [88], expriment le facteur de transcription Bcl6 qui est connu pour inhiber la glycolyse [436]. Par ailleurs, le récepteur PD-1, qui est exprimé préférentiellement par les cellules infectées, altère le programme métabolique des cellules T en inhibant la glycolyse et en promouvant l'oxydation des acides gras [437]. Ces observations suggèrent que les cellules réservoirs pourraient avoir un métabolisme cellulaire qui leur est spécifique, peu dépendant de la glycolyse. Une meilleure compréhension du métabolisme des cellules infectées de manière latente devrait ouvrir la voie à la mise en place de nouvelles stratégies thérapeutiques.

Conclusion générale

Près de 40 ans après sa découverte, le VIH-1 reste toujours un problème majeur de santé publique à travers le monde. L'introduction de la trithérapie en 1996 a largement amélioré la qualité et la durée de vie des personnes infectées par le VIH. Néanmoins, bien que la thérapie antirétrovirale diminue de façon drastique la charge virale plasmatique, elle n'élimine pas complètement le virus. En effet, la persistance du virus dans une multitude de réservoirs cellulaires et anatomiques est une barrière considérable à l'élimination du virus et à l'obtention d'une guérison fonctionnelle pour les patients atteints par le VIH.

L'élimination des réservoirs viraux dans lesquels le virus persiste par réplication résiduelle et/ou par latence requiert une compréhension approfondie du phénomène de persistance virale, pointant l'importance de développer de nouveaux outils facilitant l'étude de ce phénomène. Le HIV-Flow, une nouvelle technique facile et rapide développée dans notre laboratoire et permettant la détection des cellules réservoirs par cytométrie en flux, constitue un outil de choix pour mieux étudier et comprendre la persistance virale, et ce dans divers sites anatomiques qui constituent des réservoirs de prédilection pour le virus.

La plupart des études qui se sont intéressées aux mécanismes moléculaires responsables de la latence virale ont été effectuées sur lignées cellulaires ou sur cellules primaires infectées *in vitro* qui ne récapitulent pas la complexité du phénomène de latence *in vivo*. De plus, la majorité de ces études ont été réalisées sur lymphocytes T CD4 mémoires totaux, et ne tiennent pas compte de l'hétérogénéité de cette population cellulaire. Grâce à la mise au point de protocoles de cytométrie en flux, nous avons montré que plusieurs facteurs impliqués dans l'expression virale (*i.e.* histones acétylées, forme active de NF- κ B et P-TEFb) sont exprimés à différents niveaux dans les 3 sous-populations de lymphocytes T CD4 mémoires (T_{CM} , T_{TM} , T_{EM}), et que les agents anti-latence induisent des réponses pharmacologiques distinctes entre ces sous-populations. Par ailleurs, le développement du HIV-Flow a permis d'identifier une combinaison d'agents anti-latence qui réactive très efficacement la production virale dans les T_{CM} , à des niveaux similaires à ceux induits par la PMA/ionomycine. Ces résultats démontrent l'importance de tenir compte de l'hétérogénéité cellulaire des lymphocytes T CD4+ mémoires dans les futures études visant à identifier les mécanismes moléculaires responsables de la latence virale.

La mise au point du HIV-Flow a grandement facilité l'étude du phénotype des cellules réservoirs. Grâce à cette technique, nous avons montré que les populations PD-1+ et TIGIT+ sont préférentiellement enrichies en virus compétents pour la traduction protéique chez les individus

sous thérapie antirétrovirale. Nous avons également identifié une molécule préférentiellement exprimée à la surface des cellules réservoirs, l'intégrine $\alpha 4\beta 1$, montrant l'intérêt d'utiliser cette technique pour la découverte de nouveaux marqueurs d'enrichissement. Par ailleurs, cette technique offre l'avantage d'étudier le phénotype des cellules infectées dans toute une série de tissus, incluant les ganglions lymphatiques, l'intestin, et la moelle osseuse.

Enfin, le développement du HIV-Flow facilite grandement l'étude de questions centrales au phénomène de persistance virale. Les applications et perspectives sont nombreuses, comme mentionné dans la discussion. Citons entre autres l'utilisation du HIV-Flow pour étudier l'expansion clonale, et le concept de *wax and wane* qui suggère que certains clones peuvent persister pour de longues périodes (mois à années), tandis que d'autres clones croissent et décroissent. Citons également l'utilisation du HIV-Flow pour étudier la production active résiduelle dans divers sites anatomiques, qui est une importante composante du rebond viral observé après arrêt du traitement.

En conclusion, en permettant une meilleure compréhension des mécanismes de persistance virale et du phénotype des cellules réservoirs dans divers compartiments anatomiques, nos travaux devraient ouvrir la voie à l'élaboration de nouvelles stratégies thérapeutiques, dans le but d'aboutir à la rémission des personnes infectées par le VIH.

Annexe 1

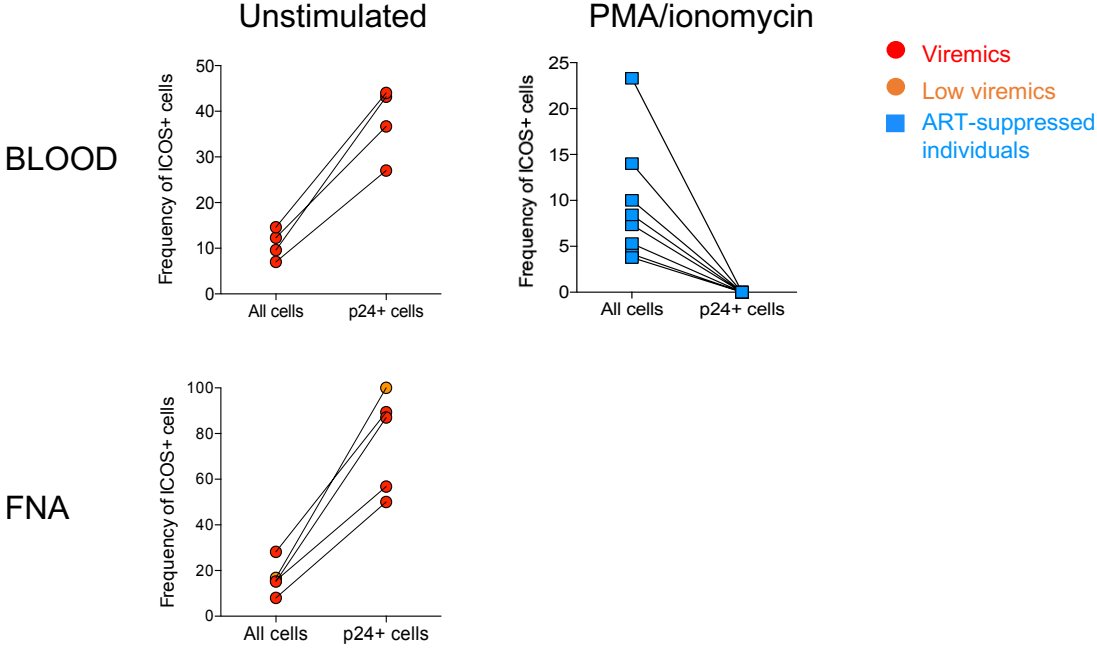


Figure 1: ICOS is preferentially expressed by productively infected cells in the blood and lymph nodes from viremic individuals. The contribution of memory ICOS+ cells to the pool of all cells and to the pool of infected cells (p24+) are compared in blood samples from n=4 viremic individuals and lymph nodes from 5 viremic individuals (left panel, no stimulation), and in blood samples from n=8 ART-suppressed individuals (right panel, PMA/ionomycin stimulation).

Bibliographie

1. UNAIDS. *Global HIV & AIDS statistics — 2018 fact sheet*. 2018; Available from: <http://www.unaids.org/en/resources/fact-sheet>.
2. Taylor, B.S., et al., *The challenge of HIV-1 subtype diversity*. N Engl J Med, 2008. **358**(15): p. 1590-602.
3. Shaw, G.M. and E. Hunter, *HIV transmission*. Cold Spring Harb Perspect Med, 2012. **2**(11).
4. Grulich, A.E. and I. Zablotska, *Commentary: probability of HIV transmission through anal intercourse*. Int J Epidemiol, 2010. **39**(4): p. 1064-5.
5. Kelley, C.F., et al., *The rectal mucosa and condomless receptive anal intercourse in HIV-negative MSM: implications for HIV transmission and prevention*. Mucosal Immunol, 2017. **10**(4): p. 996-1007.
6. Turner, B.G. and M.F. Summers, *Structural biology of HIV*. J Mol Biol, 1999. **285**(1): p. 1-32.
7. Coffin, J.M., S.H. Hughes, and H.E. Varmus, *The Interactions of Retroviruses and their Hosts*, in *Retroviruses*, J.M. Coffin, S.H. Hughes, and H.E. Varmus, Editors. 1997: Cold Spring Harbor (NY).
8. Frankel, A.D. and J.A. Young, *HIV-1: fifteen proteins and an RNA*. Annu Rev Biochem, 1998. **67**: p. 1-25.
9. Moore, J.P., *Coreceptors: implications for HIV pathogenesis and therapy*. Science, 1997. **276**(5309): p. 51-2.
10. Deng, H., et al., *Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1*. Nature, 1996. **381**(6584): p. 661-6.
11. Clapham, P.R. and A. McKnight, *HIV-1 receptors and cell tropism*. Br Med Bull, 2001. **58**: p. 43-59.
12. Berger, E.A., P.M. Murphy, and J.M. Farber, *Chemokine receptors as HIV-1 coreceptors: roles in viral entry, tropism, and disease*. Annu Rev Immunol, 1999. **17**: p. 657-700.
13. Lee, B., et al., *Quantification of CD4, CCR5, and CXCR4 levels on lymphocyte subsets, dendritic cells, and differentially conditioned monocyte-derived macrophages*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(9): p. 5215-20.
14. Thomas, E.R., et al., *Macrophage entry mediated by HIV Envs from brain and lymphoid tissues is determined by the capacity to use low CD4 levels and overall efficiency of fusion*. Virology, 2007. **360**(1): p. 105-19.
15. Beauparlant, D., et al., *Delineating CD4 dependency of HIV-1: Adaptation to infect low level CD4 expressing target cells widens cellular tropism but severely impacts on envelope functionality*. PLoS Pathog, 2017. **13**(3): p. e1006255.
16. Gallo, S.A., et al., *The HIV Env-mediated fusion reaction*. Biochim Biophys Acta, 2003. **1614**(1): p. 36-50.
17. Wu, Y. and A. Yoder, *Chemokine coreceptor signaling in HIV-1 infection and pathogenesis*. PLoS Pathog, 2009. **5**(12): p. e1000520.
18. Yoder, A., et al., *HIV envelope-CXCR4 signaling activates cofilin to overcome cortical actin restriction in resting CD4 T cells*. Cell, 2008. **134**(5): p. 782-92.
19. Telesnitsky, A. and S.P. Goff, *Reverse Transcriptase and the Generation of Retroviral DNA*, in *Retroviruses*, J.M. Coffin, S.H. Hughes, and H.E. Varmus, Editors. 1997: Cold Spring Harbor (NY).
20. Hu, W.S. and S.H. Hughes, *HIV-1 reverse transcription*. Cold Spring Harb Perspect Med, 2012. **2**(10).
21. Miller, M.D., C.M. Farnet, and F.D. Bushman, *Human immunodeficiency virus type 1 preintegration complexes: studies of organization and composition*. J Virol, 1997. **71**(7): p. 5382-90.
22. Delelis, O., et al., *Integrase and integration: biochemical activities of HIV-1 integrase*. Retrovirology, 2008. **5**: p. 114.

23. Craigie, R. and F.D. Bushman, *HIV DNA integration*. Cold Spring Harb Perspect Med, 2012. **2**(7): p. a006890.
24. Han, Y., et al., *Resting CD4+ T cells from human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-infected individuals carry integrated HIV-1 genomes within actively transcribed host genes*. J Virol, 2004. **78**(12): p. 6122-33.
25. Shun, M.C., et al., *LEDGF/p75 functions downstream from preintegration complex formation to effect gene-specific HIV-1 integration*. Genes Dev, 2007. **21**(14): p. 1767-78.
26. Karn, J. and C.M. Stoltzfus, *Transcriptional and posttranscriptional regulation of HIV-1 gene expression*. Cold Spring Harb Perspect Med, 2012. **2**(2): p. a006916.
27. Murakami, T., *Retroviral env glycoprotein trafficking and incorporation into virions*. Mol Biol Int, 2012. **2012**: p. 682850.
28. Bieniasz, P.D., *The cell biology of HIV-1 virion genesis*. Cell Host Microbe, 2009. **5**(6): p. 550-8.
29. Sundquist, W.I. and H.G. Krausslich, *HIV-1 assembly, budding, and maturation*. Cold Spring Harb Perspect Med, 2012. **2**(7): p. a006924.
30. Pantaleo, G., C. Graziosi, and A.S. Fauci, *The immunopathogenesis of human immunodeficiency virus infection*. N Engl J Med, 1993. **328**(5): p. 327-35.
31. Weber, J., *The pathogenesis of HIV-1 infection*. Br Med Bull, 2001. **58**: p. 61-72.
32. Mogensen, T.H., et al., *Innate immune recognition and activation during HIV infection*. Retrovirology, 2010. **7**: p. 54.
33. Wu, L. and V.N. KewalRamani, *Dendritic-cell interactions with HIV: infection and viral dissemination*. Nat Rev Immunol, 2006. **6**(11): p. 859-68.
34. Turville, S.G., et al., *Diversity of receptors binding HIV on dendritic cell subsets*. Nat Immunol, 2002. **3**(10): p. 975-83.
35. Perreau, M., et al., *Follicular helper T cells serve as the major CD4 T cell compartment for HIV-1 infection, replication, and production*. J Exp Med, 2013. **210**(1): p. 143-56.
36. Ma, Z.M., et al., *Lymphatic Dissemination of Simian Immunodeficiency Virus after Penile Inoculation*. J Virol, 2016. **90**(8): p. 4093-4104.
37. McDonald, D., *Dendritic Cells and HIV-1 Trans-Infection*. Viruses, 2010. **2**(8): p. 1704-17.
38. Guadalupe, M., et al., *Severe CD4+ T-cell depletion in gut lymphoid tissue during primary human immunodeficiency virus type 1 infection and substantial delay in restoration following highly active antiretroviral therapy*. J Virol, 2003. **77**(21): p. 11708-17.
39. Mehandru, S., et al., *Primary HIV-1 infection is associated with preferential depletion of CD4+ T lymphocytes from effector sites in the gastrointestinal tract*. J Exp Med, 2004. **200**(6): p. 761-70.
40. Kahn, J.O. and B.D. Walker, *Acute human immunodeficiency virus type 1 infection*. N Engl J Med, 1998. **339**(1): p. 33-9.
41. Schacker, T.W., et al., *Biological and virologic characteristics of primary HIV infection*. Ann Intern Med, 1998. **128**(8): p. 613-20.
42. Mellors, J.W., et al., *Prognosis in HIV-1 infection predicted by the quantity of virus in plasma*. Science, 1996. **272**(5265): p. 1167-70.
43. Klatt, N.R., N.T. Funderburg, and J.M. Brenchley, *Microbial translocation, immune activation, and HIV disease*. Trends Microbiol, 2013. **21**(1): p. 6-13.
44. Sokoya, T., et al., *HIV as a Cause of Immune Activation and Immunosenescence*. Mediators Inflamm, 2017. **2017**: p. 6825493.
45. Harris, R.S., J.F. Hultquist, and D.T. Evans, *The restriction factors of human immunodeficiency virus*. J Biol Chem, 2012. **287**(49): p. 40875-83.
46. St Gelais, C., et al., *A Cyclin-Binding Motif in Human SAMHD1 Is Required for Its HIV-1 Restriction, dNTPase Activity, Tetramer Formation, and Efficient Phosphorylation*. J Virol, 2018. **92**(6).
47. Descours, B., et al., *SAMHD1 restricts HIV-1 reverse transcription in quiescent CD4(+) T-cells*. Retrovirology, 2012. **9**: p. 87.

48. Baldauf, H.M., et al., *SAMHD1 restricts HIV-1 infection in resting CD4(+) T cells*. Nat Med, 2012. **18**(11): p. 1682-7.
49. Hofmann, H., et al., *The Vpx lentiviral accessory protein targets SAMHD1 for degradation in the nucleus*. J Virol, 2012. **86**(23): p. 12552-60.
50. Coiras, M., et al., *IL-7 Induces SAMHD1 Phosphorylation in CD4+ T Lymphocytes, Improving Early Steps of HIV-1 Life Cycle*. Cell Rep, 2016. **14**(9): p. 2100-2107.
51. Stremlau, M., et al., *The cytoplasmic body component TRIM5alpha restricts HIV-1 infection in Old World monkeys*. Nature, 2004. **427**(6977): p. 848-53.
52. Ribeiro, C.M., et al., *Receptor usage dictates HIV-1 restriction by human TRIM5alpha in dendritic cell subsets*. Nature, 2016. **540**(7633): p. 448-452.
53. Jimenez-Guardeno, J.M., et al., *Immunoproteasome activation enables human TRIM5alpha restriction of HIV-1*. Nat Microbiol, 2019. **4**(6): p. 933-940.
54. Altfeld, M. and M. Gale, Jr., *Innate immunity against HIV-1 infection*. Nat Immunol, 2015. **16**(6): p. 554-62.
55. Brass, A.L., et al., *Identification of host proteins required for HIV infection through a functional genomic screen*. Science, 2008. **319**(5865): p. 921-6.
56. Zhu, J., et al., *Comprehensive identification of host modulators of HIV-1 replication using multiple orthologous RNAi reagents*. Cell Rep, 2014. **9**(2): p. 752-66.
57. Park, R.J., et al., *A genome-wide CRISPR screen identifies a restricted set of HIV host dependency factors*. Nat Genet, 2017. **49**(2): p. 193-203.
58. Schott, K. and R. Konig, *Picking the Survivor! CRISPR Reveals HIV Dependency Factors*. Trends Microbiol, 2017. **25**(4): p. 243-245.
59. Arts, E.J. and D.J. Hazuda, *HIV-1 antiretroviral drug therapy*. Cold Spring Harb Perspect Med, 2012. **2**(4): p. a007161.
60. Tang, M.W. and R.W. Shafer, *HIV-1 antiretroviral resistance: scientific principles and clinical applications*. Drugs, 2012. **72**(9): p. e1-25.
61. Palella, F.J., Jr., et al., *Declining morbidity and mortality among patients with advanced human immunodeficiency virus infection. HIV Outpatient Study Investigators*. N Engl J Med, 1998. **338**(13): p. 853-60.
62. Margolis, A.M., et al., *A review of the toxicity of HIV medications*. J Med Toxicol, 2014. **10**(1): p. 26-39.
63. Chun, T.W., et al., *Quantification of latent tissue reservoirs and total body viral load in HIV-1 infection*. Nature, 1997. **387**(6629): p. 183-8.
64. Chun, T.W., et al., *Presence of an inducible HIV-1 latent reservoir during highly active antiretroviral therapy*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(24): p. 13193-7.
65. Finzi, D., et al., *Identification of a reservoir for HIV-1 in patients on highly active antiretroviral therapy*. Science, 1997. **278**(5341): p. 1295-300.
66. Wong, J.K., et al., *Recovery of replication-competent HIV despite prolonged suppression of plasma viremia*. Science, 1997. **278**(5341): p. 1291-5.
67. Deeks, S.G., et al., *International AIDS Society global scientific strategy: towards an HIV cure 2016*. Nat Med, 2016. **22**(8): p. 839-50.
68. Alexaki, A., Y. Liu, and B. Wigdahl, *Cellular reservoirs of HIV-1 and their role in viral persistence*. Curr HIV Res, 2008. **6**(5): p. 388-400.
69. Wong, J.K. and S.A. Yukl, *Tissue reservoirs of HIV*. Curr Opin HIV AIDS, 2016. **11**(4): p. 362-70.
70. Westermann, J. and R. Pabst, *Distribution of lymphocyte subsets and natural killer cells in the human body*. Clin Investig, 1992. **70**(7): p. 539-44.
71. Ho Tsong Fang, R., A.D. Colantonio, and C.H. Uittenbogaart, *The role of the thymus in HIV infection: a 10 year perspective*. AIDS, 2008. **22**(2): p. 171-84.
72. Joshi, V.V., et al., *Thymus biopsy in children with acquired immunodeficiency syndrome*. Arch Pathol Lab Med, 1986. **110**(9): p. 837-42.
73. Baskin, G.B., et al., *Thymus in simian immunodeficiency virus-infected rhesus monkeys*. Lab Invest, 1991. **65**(4): p. 400-7.

74. Shen, A., et al., *Resting CD4+ T lymphocytes but not thymocytes provide a latent viral reservoir in a simian immunodeficiency virus-Macaca nemestrina model of human immunodeficiency virus type 1-infected patients on highly active antiretroviral therapy.* J Virol, 2003. **77**(8): p. 4938-49.
75. Deere, J.D., et al., *Analysis of multiply spliced transcripts in lymphoid tissue reservoirs of rhesus macaques infected with RT-SHIV during HAART.* PLoS One, 2014. **9**(2): p. e87914.
76. Denton, P.W., et al., *Targeted cytotoxic therapy kills persisting HIV infected cells during ART.* PLoS Pathog, 2014. **10**(1): p. e1003872.
77. Hoang, T.N., et al., *Bone Marrow-Derived CD4(+) T Cells Are Depleted in Simian Immunodeficiency Virus-Infected Macaques and Contribute to the Size of the Replication-Competent Reservoir.* J Virol, 2019. **93**(1).
78. Durand, C.M., et al., *HIV-1 DNA is detected in bone marrow populations containing CD4+ T cells but is not found in purified CD34+ hematopoietic progenitor cells in most patients on antiretroviral therapy.* J Infect Dis, 2012. **205**(6): p. 1014-8.
79. Carter, C.C., et al., *HIV-1 infects multipotent progenitor cells causing cell death and establishing latent cellular reservoirs.* Nat Med, 2010. **16**(4): p. 446-51.
80. Sebastian, N.T., et al., *CD4 is expressed on a heterogeneous subset of hematopoietic progenitors, which persistently harbor CXCR4 and CCR5-tropic HIV proviral genomes in vivo.* PLoS Pathog, 2017. **13**(7): p. e1006509.
81. Dimopoulos, Y., E. Moysi, and C. Petrovas, *The Lymph Node in HIV Pathogenesis.* Curr HIV/AIDS Rep, 2017. **14**(4): p. 133-140.
82. Crotty, S., *T Follicular Helper Cell Biology: A Decade of Discovery and Diseases.* Immunity, 2019. **50**(5): p. 1132-1148.
83. Yu, D. and C.G. Vinuesa, *The elusive identity of T follicular helper cells.* Trends Immunol, 2010. **31**(10): p. 377-83.
84. Pantaleo, G., et al., *Lymphoid organs function as major reservoirs for human immunodeficiency virus.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(21): p. 9838-42.
85. Pantaleo, G., et al., *HIV infection is active and progressive in lymphoid tissue during the clinically latent stage of disease.* Nature, 1993. **362**(6418): p. 355-8.
86. Pantaleo, G., C. Graziosi, and A.S. Fauci, *The role of lymphoid organs in the pathogenesis of HIV infection.* Semin Immunol, 1993. **5**(3): p. 157-63.
87. Kohler, S.L., et al., *Germinal Center T Follicular Helper Cells Are Highly Permissive to HIV-1 and Alter Their Phenotype during Virus Replication.* J Immunol, 2016. **196**(6): p. 2711-22.
88. Banga, R., et al., *PD-1(+) and follicular helper T cells are responsible for persistent HIV-1 transcription in treated aviremic individuals.* Nat Med, 2016. **22**(7): p. 754-61.
89. Deleage, C., et al., *Defining HIV and SIV Reservoirs in Lymphoid Tissues.* Pathog Immun, 2016. **1**(1): p. 68-106.
90. Estes, J.D., et al., *Defining total-body AIDS-virus burden with implications for curative strategies.* Nat Med, 2017. **23**(11): p. 1271-1276.
91. Baiyegunhi, O., F.; Ismail, N.; Dong, K.; Walker, B.D.; Ndungu, T.; Ndhlovu, Z. *HIV RNA persists long-term in lymph nodes of individuals initiated on ART in fiebig I.* in CROI. 2018. Boston, Massachusetts.
92. Fletcher, C.V., et al., *Persistent HIV-1 replication is associated with lower antiretroviral drug concentrations in lymphatic tissues.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2014. **111**(6): p. 2307-12.
93. Connick, E., et al., *Compartmentalization of simian immunodeficiency virus replication within secondary lymphoid tissues of rhesus macaques is linked to disease stage and inversely related to localization of virus-specific CTL.* J Immunol, 2014. **193**(11): p. 5613-25.
94. Connick, E., et al., *CTL fail to accumulate at sites of HIV-1 replication in lymphoid tissue.* J Immunol, 2007. **178**(11): p. 6975-83.
95. Reuter, M.A., et al., *HIV-Specific CD8(+) T Cells Exhibit Reduced and Differentially Regulated Cytolytic Activity in Lymphoid Tissue.* Cell Rep, 2017. **21**(12): p. 3458-3470.
96. Bronnimann, M.P., P.J. Skinner, and E. Connick, *The B-Cell Follicle in HIV Infection: Barrier to a Cure.* Front Immunol, 2018. **9**: p. 20.

97. Buggert, M., et al., *Limited immune surveillance in lymphoid tissue by cytolytic CD4+ T cells during health and HIV disease*. PLoS Pathog, 2018. **14**(4): p. e1006973.
98. Smith, B.A., et al., *Persistence of infectious HIV on follicular dendritic cells*. J Immunol, 2001. **166**(1): p. 690-6.
99. Dave, R.S., P. Jain, and S.N. Byrareddy, *Follicular Dendritic Cells of Lymph Nodes as Human Immunodeficiency Virus/Simian Immunodeficiency Virus Reservoirs and Insights on Cervical Lymph Node*. Front Immunol, 2018. **9**: p. 805.
100. Miles, B., et al., *Follicular regulatory T cells impair follicular T helper cells in HIV and SIV infection*. Nat Commun, 2015. **6**: p. 8608.
101. Miles, B., et al., *Follicular Regulatory CD8 T Cells Impair the Germinal Center Response in SIV and Ex Vivo HIV Infection*. PLoS Pathog, 2016. **12**(10): p. e1005924.
102. Mowat, A.M. and J.L. Viney, *The anatomical basis of intestinal immunity*. Immunol Rev, 1997. **156**: p. 145-66.
103. Mehandru, S., et al., *Lack of mucosal immune reconstitution during prolonged treatment of acute and early HIV-1 infection*. PLoS Med, 2006. **3**(12): p. e484.
104. Estes, J., et al., *Collagen deposition limits immune reconstitution in the gut*. J Infect Dis, 2008. **198**(4): p. 456-64.
105. Rueda, C.M., et al., *HIV-induced T-cell activation/exhaustion in rectal mucosa is controlled only partially by antiretroviral treatment*. PLoS One, 2012. **7**(1): p. e30307.
106. Chun, T.W., et al., *Persistence of HIV in gut-associated lymphoid tissue despite long-term antiretroviral therapy*. J Infect Dis, 2008. **197**(5): p. 714-20.
107. Yukl, S.A., et al., *Differences in HIV burden and immune activation within the gut of HIV-positive patients receiving suppressive antiretroviral therapy*. J Infect Dis, 2010. **202**(10): p. 1553-61.
108. Yukl, S.A., et al., *The distribution of HIV DNA and RNA in cell subsets differs in gut and blood of HIV-positive patients on ART: implications for viral persistence*. J Infect Dis, 2013. **208**(8): p. 1212-20.
109. Belmonte, L., et al., *The intestinal mucosa as a reservoir of HIV-1 infection after successful HAART*. AIDS, 2007. **21**(15): p. 2106-8.
110. Lafeuillade, A., et al., *Rectal cell-associated HIV-1 RNA: a new marker ready for the clinic*. HIV Clin Trials, 2009. **10**(5): p. 324-7.
111. McArthur, J.C., B.J. Brew, and A. Nath, *Neurological complications of HIV infection*. Lancet Neurol, 2005. **4**(9): p. 543-55.
112. Jordan, C.A., et al., *Infection of brain microglial cells by human immunodeficiency virus type 1 is CD4 dependent*. J Virol, 1991. **65**(2): p. 736-42.
113. Cenker, J.J., R.D. Stultz, and D. McDonald, *Brain Microglial Cells Are Highly Susceptible to HIV-1 Infection and Spread*. AIDS Res Hum Retroviruses, 2017. **33**(11): p. 1155-1165.
114. Kumar, A.M., et al., *Human immunodeficiency virus type 1 RNA Levels in different regions of human brain: quantification using real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction*. J Neurovirol, 2007. **13**(3): p. 210-24.
115. Langford, D., et al., *Relationship of antiretroviral treatment to postmortem brain tissue viral load in human immunodeficiency virus-infected patients*. J Neurovirol, 2006. **12**(2): p. 100-7.
116. Canestri, A., et al., *Discordance between cerebral spinal fluid and plasma HIV replication in patients with neurological symptoms who are receiving suppressive antiretroviral therapy*. Clin Infect Dis, 2010. **50**(5): p. 773-8.
117. Enting, R.H., et al., *Antiretroviral drugs and the central nervous system*. AIDS, 1998. **12**(15): p. 1941-55.
118. Groothuis, D.R. and R.M. Levy, *The entry of antiviral and antiretroviral drugs into the central nervous system*. J Neurovirol, 1997. **3**(6): p. 387-400.
119. Letendre, S., et al., *Validation of the CNS Penetration-Effectiveness rank for quantifying antiretroviral penetration into the central nervous system*. Arch Neurol, 2008. **65**(1): p. 65-70.
120. Ellis, R.J., P. Calero, and M.D. Stockin, *HIV infection and the central nervous system: a primer*. Neuropsychol Rev, 2009. **19**(2): p. 144-51.

121. Gingo, M.R. and A. Morris, *Pathogenesis of HIV and the lung*. Curr HIV/AIDS Rep, 2013. **10**(1): p. 42-50.
122. Sierra-Madero, J.G., et al., *Relationship between load of virus in alveolar macrophages from human immunodeficiency virus type 1-infected persons, production of cytokines, and clinical status*. J Infect Dis, 1994. **169**(1): p. 18-27.
123. van't Wout, A.B., et al., *Analysis of the temporal relationship between human immunodeficiency virus type 1 quasispecies in sequential blood samples and various organs obtained at autopsy*. J Virol, 1998. **72**(1): p. 488-96.
124. Cribbs, S.K., et al., *Healthy HIV-1-infected individuals on highly active antiretroviral therapy harbor HIV-1 in their alveolar macrophages*. AIDS Res Hum Retroviruses, 2015. **31**(1): p. 64-70.
125. Costiniuk, C.T., et al., *HIV persistence in mucosal CD4+ T cells within the lungs of adults receiving long-term suppressive antiretroviral therapy*. AIDS, 2018. **32**(16): p. 2279-2289.
126. Taylor, S. and S. Davies, *Antiretroviral drug concentrations in the male and female genital tract: implications for the sexual transmission of HIV*. Curr Opin HIV AIDS, 2010. **5**(4): p. 335-43.
127. Else, L.J., et al., *Pharmacokinetics of antiretroviral drugs in anatomical sanctuary sites: the male and female genital tract*. Antivir Ther, 2011. **16**(8): p. 1149-67.
128. Lafeuillade, A., et al., *Differences in the detection of three HIV-1 protease inhibitors in non-blood compartments: clinical correlations*. HIV Clin Trials, 2002. **3**(1): p. 27-35.
129. Ganor, Y., et al., *HIV-1 reservoirs in urethral macrophages of patients under suppressive antiretroviral therapy*. Nat Microbiol, 2019. **4**(4): p. 633-644.
130. Wanjalla, C.N., W.J. McDonnell, and J.R. Koethe, *Adipose Tissue T Cells in HIV/SIV Infection*. Front Immunol, 2018. **9**: p. 2730.
131. Damouche, A., et al., *Adipose Tissue Is a Neglected Viral Reservoir and an Inflammatory Site during Chronic HIV and SIV Infection*. PLoS Pathog, 2015. **11**(9): p. e1005153.
132. Couturier, J., et al., *Infectious SIV resides in adipose tissue and induces metabolic defects in chronically infected rhesus macaques*. Retrovirology, 2016. **13**: p. 30.
133. Dupin, N., et al., *HIV and antiretroviral drug distribution in plasma and fat tissue of HIV-infected patients with lipodystrophy*. AIDS, 2002. **16**(18): p. 2419-24.
134. Couturier, J., et al., *Adipocytes impair efficacy of antiretroviral therapy*. Antiviral Res, 2018. **154**: p. 140-148.
135. Finzi, D., et al., *Latent infection of CD4+ T cells provides a mechanism for lifelong persistence of HIV-1, even in patients on effective combination therapy*. Nat Med, 1999. **5**(5): p. 512-7.
136. Chun, T.W., et al., *In vivo fate of HIV-1-infected T cells: quantitative analysis of the transition to stable latency*. Nat Med, 1995. **1**(12): p. 1284-90.
137. Zhou, Y., et al., *Kinetics of human immunodeficiency virus type 1 decay following entry into resting CD4+ T cells*. J Virol, 2005. **79**(4): p. 2199-210.
138. Persaud, D., et al., *Latency in human immunodeficiency virus type 1 infection: no easy answers*. J Virol, 2003. **77**(3): p. 1659-65.
139. Swiggard, W.J., et al., *Human immunodeficiency virus type 1 can establish latent infection in resting CD4+ T cells in the absence of activating stimuli*. J Virol, 2005. **79**(22): p. 14179-88.
140. Unutmaz, D., et al., *Cytokine signals are sufficient for HIV-1 infection of resting human T lymphocytes*. J Exp Med, 1999. **189**(11): p. 1735-46.
141. Saleh, S., et al., *CCR7 ligands CCL19 and CCL21 increase permissiveness of resting memory CD4+ T cells to HIV-1 infection: a novel model of HIV-1 latency*. Blood, 2007. **110**(13): p. 4161-4.
142. Lambotte, O., et al., *Detection of infectious HIV in circulating monocytes from patients on prolonged highly active antiretroviral therapy*. J Acquir Immune Defic Syndr, 2000. **23**(2): p. 114-9.

143. Zhu, T., et al., *Evidence for human immunodeficiency virus type 1 replication in vivo in CD14(+) monocytes and its potential role as a source of virus in patients on highly active antiretroviral therapy.* J Virol, 2002. **76**(2): p. 707-16.
144. Delobel, P., et al., *Persistence of distinct HIV-1 populations in blood monocytes and naive and memory CD4 T cells during prolonged suppressive HAART.* AIDS, 2005. **19**(16): p. 1739-50.
145. Gibellini, D., et al., *HIV-1 DNA load analysis in peripheral blood lymphocytes and monocytes from naive and HAART-treated individuals.* J Infect, 2008. **56**(3): p. 219-25.
146. Cattin, A., et al., *HIV-1 is rarely detected in blood and colon myeloid cells during viral-suppressive antiretroviral therapy.* AIDS, 2019. **33**(8): p. 1293-1306.
147. Abbas, W., et al., *Eradication of HIV-1 from the macrophage reservoir: an uncertain goal?* Viruses, 2015. **7**(4): p. 1578-98.
148. Carter, C.A. and L.S. Ehrlich, *Cell biology of HIV-1 infection of macrophages.* Annu Rev Microbiol, 2008. **62**: p. 425-43.
149. Reynoso, R., et al., *HIV-1 induces telomerase activity in monocyte-derived macrophages, possibly safeguarding one of its reservoirs.* J Virol, 2012. **86**(19): p. 10327-37.
150. Swingler, S., et al., *Apoptotic killing of HIV-1-infected macrophages is subverted by the viral envelope glycoprotein.* PLoS Pathog, 2007. **3**(9): p. 1281-90.
151. Perno, C.F., et al., *Relative potency of protease inhibitors in monocytes/macrophages acutely and chronically infected with human immunodeficiency virus.* J Infect Dis, 1998. **178**(2): p. 413-22.
152. Otero, M., et al., *Peripheral blood Dendritic cells are not a major reservoir for HIV type 1 in infected individuals on virally suppressive HAART.* AIDS Res Hum Retroviruses, 2003. **19**(12): p. 1097-103.
153. McNamara, L.A. and K.L. Collins, *Hematopoietic stem/precursor cells as HIV reservoirs.* Curr Opin HIV AIDS, 2011. **6**(1): p. 43-8.
154. Valentin, A., et al., *Persistent HIV-1 infection of natural killer cells in patients receiving highly active antiretroviral therapy.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(10): p. 7015-20.
155. Sundstrom, J.B., et al., *Signaling through Toll-like receptors triggers HIV-1 replication in latently infected mast cells.* J Immunol, 2004. **172**(7): p. 4391-401.
156. Kulpa, D.A. and N. Chomont, *HIV persistence in the setting of antiretroviral therapy: when, where and how does HIV hide?* J Virus Erad, 2015. **1**(2): p. 59-66.
157. Gattinoni, L., et al., *A human memory T cell subset with stem cell-like properties.* Nat Med, 2011. **17**(10): p. 1290-7.
158. Buzon, M.J., et al., *HIV-1 persistence in CD4+ T cells with stem cell-like properties.* Nat Med, 2014. **20**(2): p. 139-42.
159. Jaafoura, S., et al., *Progressive contraction of the latent HIV reservoir around a core of less-differentiated CD4(+) memory T Cells.* Nat Commun, 2014. **5**: p. 5407.
160. Lanzavecchia, A. and F. Sallusto, *Understanding the generation and function of memory T cell subsets.* Curr Opin Immunol, 2005. **17**(3): p. 326-32.
161. Mahnke, Y.D., et al., *The who's who of T-cell differentiation: human memory T-cell subsets.* Eur J Immunol, 2013. **43**(11): p. 2797-809.
162. Chomont, N., et al., *HIV reservoir size and persistence are driven by T cell survival and homeostatic proliferation.* Nat Med, 2009. **15**(8): p. 893-900.
163. Wan, Y.Y. and R.A. Flavell, *How diverse--CD4 effector T cells and their functions.* J Mol Cell Biol, 2009. **1**(1): p. 20-36.
164. Lee, G.Q., et al., *Clonal expansion of genome-intact HIV-1 in functionally polarized Th1 CD4+ T cells.* J Clin Invest, 2017. **127**(7): p. 2689-2696.
165. Kryczek, I., et al., *Human TH17 cells are long-lived effector memory cells.* Sci Transl Med, 2011. **3**(104): p. 104ra100.
166. Muranski, P., et al., *Th17 cells are long lived and retain a stem cell-like molecular signature.* Immunity, 2011. **35**(6): p. 972-85.

167. Muranski, P. and N.P. Restifo, *Essentials of Th17 cell commitment and plasticity*. Blood, 2013. **121**(13): p. 2402-14.
168. Wacleche, V.S., et al., *New insights into the heterogeneity of Th17 subsets contributing to HIV-1 persistence during antiretroviral therapy*. Retrovirology, 2016. **13**(1): p. 59.
169. Gosselin, A., et al., *HIV persists in CCR6+CD4+ T cells from colon and blood during antiretroviral therapy*. AIDS, 2017. **31**(1): p. 35-48.
170. Sun, H., et al., *Th1/17 Polarization of CD4 T Cells Supports HIV-1 Persistence during Antiretroviral Therapy*. J Virol, 2015. **89**(22): p. 11284-93.
171. Khoury, G., et al., *Persistence of integrated HIV DNA in CXCR3 + CCR6 + memory CD4+ T cells in HIV-infected individuals on antiretroviral therapy*. AIDS, 2016. **30**(10): p. 1511-20.
172. Tran, T.A., et al., *Resting regulatory CD4 T cells: a site of HIV persistence in patients on long-term effective antiretroviral therapy*. PLoS One, 2008. **3**(10): p. e3305.
173. Pallikkuth, S., et al., *Peripheral T Follicular Helper Cells Are the Major HIV Reservoir within Central Memory CD4 T Cells in Peripheral Blood from Chronically HIV-Infected Individuals on Combination Antiretroviral Therapy*. J Virol, 2015. **90**(6): p. 2718-28.
174. Moyle, G.J., M. Sadler, and N. Buss, *Plasma and cerebrospinal fluid saquinavir concentrations in patients receiving combination antiretroviral therapy*. Clin Infect Dis, 1999. **28**(2): p. 403-4.
175. Taylor, S., et al., *Poor penetration of the male genital tract by HIV-1 protease inhibitors*. AIDS, 1999. **13**(7): p. 859-60.
176. Taylor, S. and A. Pereira, *Penetration of HIV-1 protease inhibitors into CSF and semen*. HIV Med, 2000. **1 Suppl 2**: p. 18-22.
177. Kearney, M.F., et al., *Ongoing HIV Replication During ART Reconsidered*. Open Forum Infect Dis, 2017. **4**(3): p. ofx173.
178. McManus, W.B., M.J.; Spindler, J.; Wiegand, A.; Musick, A.; Wu, X.; Wells, D.; Hughes, S.H.; Keele, B.; Hoh, R.; Milush, J.; Coffin, J.M.; Mellors, J.W.; Deeks, S.G.; Kearney, M.F. *NO EVIDENCE FOR ONGOING HIV REPLICATION IN LYMPH NODES DURING SUPPRESSIVE ART*. in CROI. 2018. Boston, Massachusetts
179. Rosenbloom, D.H., A.L.; Laskey, S.B.; Siliciano, R. *REEVALUATING SIGNALS OF VIRAL REPLICATION & EVOLUTION IN LYMPHOID TISSUE DURING ART*. in CROI. 2018. Boston, Massachusetts.
180. Kearney, M.F., et al., *Lack of detectable HIV-1 molecular evolution during suppressive antiretroviral therapy*. PLoS Pathog, 2014. **10**(3): p. e1004010.
181. Josefsson, L., et al., *The HIV-1 reservoir in eight patients on long-term suppressive antiretroviral therapy is stable with few genetic changes over time*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. **110**(51): p. E4987-96.
182. Vancoillie, L., et al., *Longitudinal sequencing of HIV-1 infected patients with low-level viremia for years while on ART shows no indications for genetic evolution of the virus*. Virology, 2017. **510**: p. 185-193.
183. Dinoso, J.B., et al., *Treatment intensification does not reduce residual HIV-1 viremia in patients on highly active antiretroviral therapy*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(23): p. 9403-8.
184. Besson, G.J., et al., *Short-course raltegravir intensification does not increase 2 long terminal repeat episomal HIV-1 DNA in patients on effective antiretroviral therapy*. Clin Infect Dis, 2012. **54**(3): p. 451-3.
185. Gandhi, R.T., et al., *The effect of raltegravir intensification on low-level residual viremia in HIV-infected patients on antiretroviral therapy: a randomized controlled trial*. PLoS Med, 2010. **7**(8).
186. Hatano, H., et al., *A randomized, controlled trial of raltegravir intensification in antiretroviral-treated, HIV-infected patients with a suboptimal CD4+ T cell response*. J Infect Dis, 2011. **203**(7): p. 960-8.

187. Rasmussen, T.A., et al., *The effect of antiretroviral intensification with dolutegravir on residual virus replication in HIV-infected individuals: a randomised, placebo-controlled, double-blind trial*. *Lancet HIV*, 2018. **5**(5): p. e221-e230.
188. French, M.A., et al., *Serum immune activation markers are persistently increased in patients with HIV infection after 6 years of antiretroviral therapy despite suppression of viral replication and reconstitution of CD4+ T cells*. *J Infect Dis*, 2009. **200**(8): p. 1212-5.
189. Neuhaus, J., et al., *Markers of inflammation, coagulation, and renal function are elevated in adults with HIV infection*. *J Infect Dis*, 2010. **201**(12): p. 1788-95.
190. Pinzone, M.R., et al., *Longitudinal HIV sequencing reveals reservoir expression leading to decay which is obscured by clonal expansion*. *Nat Commun*, 2019. **10**(1): p. 728.
191. Chun, T.W., et al., *Early establishment of a pool of latently infected, resting CD4(+) T cells during primary HIV-1 infection*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998. **95**(15): p. 8869-73.
192. Whitney, J.B., et al., *Rapid seeding of the viral reservoir prior to SIV viraemia in rhesus monkeys*. *Nature*, 2014. **512**(7512): p. 74-7.
193. Okoye, A.A., et al., *Early antiretroviral therapy limits SIV reservoir establishment to delay or prevent post-treatment viral rebound*. *Nat Med*, 2018. **24**(9): p. 1430-1440.
194. Chomont, N., et al., *Maintenance of CD4+ T-cell memory and HIV persistence: keeping memory, keeping HIV*. *Curr Opin HIV AIDS*, 2011. **6**(1): p. 30-6.
195. Hosmane, N.N., et al., *Proliferation of latently infected CD4(+) T cells carrying replication-competent HIV-1: Potential role in latent reservoir dynamics*. *J Exp Med*, 2017. **214**(4): p. 959-972.
196. Wang, Z., et al., *Expanded cellular clones carrying replication-competent HIV-1 persist, wax, and wane*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2018. **115**(11): p. E2575-E2584.
197. Maldarelli, F., et al., *HIV latency. Specific HIV integration sites are linked to clonal expansion and persistence of infected cells*. *Science*, 2014. **345**(6193): p. 179-83.
198. Wagner, T.A., et al., *HIV latency. Proliferation of cells with HIV integrated into cancer genes contributes to persistent infection*. *Science*, 2014. **345**(6196): p. 570-3.
199. Anderson, E.M. and F. Maldarelli, *The role of integration and clonal expansion in HIV infection: live long and prosper*. *Retrovirology*, 2018. **15**(1): p. 71.
200. Tobin, N.H., et al., *Evidence that low-level viremias during effective highly active antiretroviral therapy result from two processes: expression of archival virus and replication of virus*. *J Virol*, 2005. **79**(15): p. 9625-34.
201. Bailey, J.R., et al., *Residual human immunodeficiency virus type 1 viremia in some patients on antiretroviral therapy is dominated by a small number of invariant clones rarely found in circulating CD4+ T cells*. *J Virol*, 2006. **80**(13): p. 6441-57.
202. Wagner, T.A., et al., *An increasing proportion of monotypic HIV-1 DNA sequences during antiretroviral treatment suggests proliferation of HIV-infected cells*. *J Virol*, 2013. **87**(3): p. 1770-8.
203. Cohn, L.B., et al., *HIV-1 integration landscape during latent and active infection*. *Cell*, 2015. **160**(3): p. 420-32.
204. Simonetti, F.R., et al., *Clonally expanded CD4+ T cells can produce infectious HIV-1 in vivo*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2016. **113**(7): p. 1883-8.
205. Lorenzi, J.C., et al., *Paired quantitative and qualitative assessment of the replication-competent HIV-1 reservoir and comparison with integrated proviral DNA*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2016. **113**(49): p. E7908-E7916.
206. Colin, L. and C. Van Lint, *Molecular control of HIV-1 postintegration latency: implications for the development of new therapeutic strategies*. *Retrovirology*, 2009. **6**: p. 111.
207. Abbas, W. and G. Herbein, *Molecular Understanding of HIV-1 Latency*. *Adv Virol*, 2012. **2012**: p. 574967.
208. Sloan, R.D. and M.A. Wainberg, *The role of unintegrated DNA in HIV infection*. *Retrovirology*, 2011. **8**: p. 52.
209. Kelly, J., et al., *Human macrophages support persistent transcription from unintegrated HIV-1 DNA*. *Virology*, 2008. **372**(2): p. 300-12.

210. Pierson, T.C., et al., *Molecular characterization of preintegration latency in human immunodeficiency virus type 1 infection*. J Virol, 2002. **76**(17): p. 8518-31.
211. Mexas, A.M., et al., *Concurrent measures of total and integrated HIV DNA monitor reservoirs and ongoing replication in eradication trials*. AIDS, 2012. **26**(18): p. 2295-306.
212. Koelsch, K.K., et al., *Dynamics of total, linear nonintegrated, and integrated HIV-1 DNA in vivo and in vitro*. J Infect Dis, 2008. **197**(3): p. 411-9.
213. Pollack, R.A., et al., *Defective HIV-1 Proviruses Are Expressed and Can Be Recognized by Cytotoxic T Lymphocytes, which Shape the Proviral Landscape*. Cell Host Microbe, 2017. **21**(4): p. 494-506 e4.
214. Imamichi, H., et al., *Defective HIV-1 proviruses produce novel protein-coding RNA species in HIV-infected patients on combination antiretroviral therapy*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2016. **113**(31): p. 8783-8.
215. Bruner, K.M., et al., *Defective proviruses rapidly accumulate during acute HIV-1 infection*. Nat Med, 2016. **22**(9): p. 1043-9.
216. Allis, C.D. and T. Jenuwein, *The molecular hallmarks of epigenetic control*. Nat Rev Genet, 2016. **17**(8): p. 487-500.
217. Jiang, G., et al., *HIV latency is reversed by ACSS2-driven histone crotonylation*. J Clin Invest, 2018. **128**(3): p. 1190-1198.
218. Defossez, P.A. and I. Stancheva, *Biological functions of methyl-CpG-binding proteins*. Prog Mol Biol Transl Sci, 2011. **101**: p. 377-98.
219. Kauder, S.E., et al., *Epigenetic regulation of HIV-1 latency by cytosine methylation*. PLoS Pathog, 2009. **5**(6): p. e1000495.
220. Blazkova, J., et al., *CpG methylation controls reactivation of HIV from latency*. PLoS Pathog, 2009. **5**(8): p. e1000554.
221. Blazkova, J., et al., *Paucity of HIV DNA methylation in latently infected, resting CD4+ T cells from infected individuals receiving antiretroviral therapy*. J Virol, 2012. **86**(9): p. 5390-2.
222. Palacios, J.A., et al., *Long-term nonprogressor and elite controller patients who control viremia have a higher percentage of methylation in their HIV-1 proviral promoters than aviremic patients receiving highly active antiretroviral therapy*. J Virol, 2012. **86**(23): p. 13081-4.
223. Trejbalova, K., et al., *Development of 5' LTR DNA methylation of latent HIV-1 provirus in cell line models and in long-term-infected individuals*. Clin Epigenetics, 2016. **8**: p. 19.
224. Turner, A.W. and D.M. Margolis, *Chromatin Regulation and the Histone Code in HIV Latency*. Yale J Biol Med, 2017. **90**(2): p. 229-243.
225. Wang, Z., et al., *Combinatorial patterns of histone acetylations and methylations in the human genome*. Nat Genet, 2008. **40**(7): p. 897-903.
226. Chougui, G. and F. Margottin-Goguet, *HUSH, a Link Between Intrinsic Immunity and HIV Latency*. Front Microbiol, 2019. **10**: p. 224.
227. Tchasovnikarova, I.A., et al., *GENE SILENCING. Epigenetic silencing by the HUSH complex mediates position-effect variegation in human cells*. Science, 2015. **348**(6242): p. 1481-1485.
228. Huang, H., et al., *A CRISPR/Cas9 screen identifies the histone demethylase MINA53 as a novel HIV-1 latency-promoting gene (LPG)*. Nucleic Acids Res, 2019.
229. Matalon, S., T.A. Rasmussen, and C.A. Dinarello, *Histone deacetylase inhibitors for purging HIV-1 from the latent reservoir*. Mol Med, 2011. **17**(5-6): p. 466-72.
230. Marban, C., et al., *Recruitment of chromatin-modifying enzymes by CTIP2 promotes HIV-1 transcriptional silencing*. EMBO J, 2007. **26**(2): p. 412-23.
231. Christian, F., E.L. Smith, and R.J. Carmody, *The Regulation of NF-kappaB Subunits by Phosphorylation*. Cells, 2016. **5**(1).
232. Williams, S.A., et al., *NF-kappaB p50 promotes HIV latency through HDAC recruitment and repression of transcriptional initiation*. EMBO J, 2006. **25**(1): p. 139-49.
233. Nabel, G. and D. Baltimore, *An inducible transcription factor activates expression of human immunodeficiency virus in T cells*. Nature, 1987. **326**(6114): p. 711-3.

234. Chao, S.H. and D.H. Price, *Flavopiridol inactivates P-TEFb and blocks most RNA polymerase II transcription in vivo*. J Biol Chem, 2001. **276**(34): p. 31793-9.
235. Budhiraja, S., et al., *Cyclin T1 and CDK9 T-loop phosphorylation are downregulated during establishment of HIV-1 latency in primary resting memory CD4+ T cells*. J Virol, 2013. **87**(2): p. 1211-20.
236. Chiang, K., T.L. Sung, and A.P. Rice, *Regulation of cyclin T1 and HIV-1 Replication by microRNAs in resting CD4+ T lymphocytes*. J Virol, 2012. **86**(6): p. 3244-52.
237. Peterlin, B.M., J.E. Brogie, and D.H. Price, *7SK snRNA: a noncoding RNA that plays a major role in regulating eukaryotic transcription*. Wiley Interdiscip Rev RNA, 2012. **3**(1): p. 92-103.
238. Mbonye, U.R., et al., *Phosphorylation of CDK9 at Ser175 enhances HIV transcription and is a marker of activated P-TEFb in CD4(+) T lymphocytes*. PLoS Pathog, 2013. **9**(5): p. e1003338.
239. Jang, M.K., et al., *The bromodomain protein Brd4 is a positive regulatory component of P-TEFb and stimulates RNA polymerase II-dependent transcription*. Mol Cell, 2005. **19**(4): p. 523-34.
240. Dey, A., et al., *The double bromodomain protein Brd4 binds to acetylated chromatin during interphase and mitosis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(15): p. 8758-63.
241. Wahid, F., et al., *MicroRNAs: synthesis, mechanism, function, and recent clinical trials*. Biochim Biophys Acta, 2010. **1803**(11): p. 1231-43.
242. He, L. and G.J. Hannon, *MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation*. Nat Rev Genet, 2004. **5**(7): p. 522-31.
243. Rice, A.P., *Roles of microRNAs and long-noncoding RNAs in human immunodeficiency virus replication*. Wiley Interdiscip Rev RNA, 2015. **6**(6): p. 661-70.
244. Barichievy, S., J. Naidoo, and M.M. Mhlanga, *Non-coding RNAs and HIV: viral manipulation of host dark matter to shape the cellular environment*. Front Genet, 2015. **6**: p. 108.
245. Huang, J., et al., *Cellular microRNAs contribute to HIV-1 latency in resting primary CD4+ T lymphocytes*. Nat Med, 2007. **13**(10): p. 1241-7.
246. Ruelas, D.S., et al., *MicroRNA-155 Reinforces HIV Latency*. J Biol Chem, 2015. **290**(22): p. 13736-48.
247. Ahluwalia, J.K., et al., *Human cellular microRNA hsa-miR-29a interferes with viral nef protein expression and HIV-1 replication*. Retrovirology, 2008. **5**: p. 117.
248. Patel, P., et al., *The microRNA miR-29a is associated with human immunodeficiency virus latency*. Retrovirology, 2014. **11**: p. 108.
249. Frattari, G., L. Aagaard, and P.W. Denton, *The role of miR-29a in HIV-1 replication and latency*. J Virus Erad, 2017. **3**(4): p. 185-191.
250. Siliciano, J.D., et al., *Long-term follow-up studies confirm the stability of the latent reservoir for HIV-1 in resting CD4+ T cells*. Nat Med, 2003. **9**(6): p. 727-8.
251. Crooks, A.M., et al., *Precise Quantitation of the Latent HIV-1 Reservoir: Implications for Eradication Strategies*. J Infect Dis, 2015. **212**(9): p. 1361-5.
252. Hutter, G., et al., *Long-term control of HIV by CCR5 Delta32/Delta32 stem-cell transplantation*. N Engl J Med, 2009. **360**(7): p. 692-8.
253. Allers, K., et al., *Evidence for the cure of HIV infection by CCR5Delta32/Delta32 stem cell transplantation*. Blood, 2011. **117**(10): p. 2791-9.
254. Brown, T.R., *I am the Berlin patient: a personal reflection*. AIDS Res Hum Retroviruses, 2015. **31**(1): p. 2-3.
255. Gupta, R.K., et al., *HIV-1 remission following CCR5Delta32/Delta32 haematopoietic stem-cell transplantation*. Nature, 2019.
256. Scarborough, R.J., R.P. Goguen, and A. Gatignol, *A second patient cured of HIV infection: hopes and limitations*. Virologie (Montrouge), 2019. **23**(3): p. 1-4.
257. Pham, H.T. and T. Mesplede, *The latest evidence for possible HIV-1 curative strategies*. Drugs Context, 2018. **7**: p. 212522.
258. Tebas, P., et al., *Gene editing of CCR5 in autologous CD4 T cells of persons infected with HIV*. N Engl J Med, 2014. **370**(10): p. 901-10.

259. Yu, S., et al., *Simultaneous Knockout of CXCR4 and CCR5 Genes in CD4+ T Cells via CRISPR/Cas9 Confers Resistance to Both X4- and R5-Tropic Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection*. Hum Gene Ther, 2018. **29**(1): p. 51-67.
260. Jerome, K.R., *Disruption or Excision of Provirus as an Approach to HIV Cure*. AIDS Patient Care STDS, 2016. **30**(12): p. 551-555.
261. Xiao, Q., D. Guo, and S. Chen, *Application of CRISPR/Cas9-Based Gene Editing in HIV-1/AIDS Therapy*. Front Cell Infect Microbiol, 2019. **9**: p. 69.
262. Yin, C., et al., *In Vivo Excision of HIV-1 Provirus by saCas9 and Multiplex Single-Guide RNAs in Animal Models*. Mol Ther, 2017. **25**(5): p. 1168-1186.
263. Liang, C., et al., *CRISPR/Cas9: a double-edged sword when used to combat HIV infection*. Retrovirology, 2016. **13**(1): p. 37.
264. Persaud, D., et al., *Absence of detectable HIV-1 viremia after treatment cessation in an infant*. N Engl J Med, 2013. **369**(19): p. 1828-35.
265. Ananworanich, J. and M.L. Robb, *The transient HIV remission in the Mississippi baby: why is this good news?* J Int AIDS Soc, 2014. **17**: p. 19859.
266. Frange, P., et al., *HIV-1 virological remission lasting more than 12 years after interruption of early antiretroviral therapy in a perinatally infected teenager enrolled in the French ANRS EPF-CO10 paediatric cohort: a case report*. Lancet HIV, 2016. **3**(1): p. e49-54.
267. Violari, A.e.a., *Viral and host characteristics of a child with perinatal HIV-1 following a prolonged period after ART cessation in the CHER trial*, in 9th IAS Conference on HIV Science. 2017: Paris.
268. Hocqueloux, L., et al., *Long-term immunovirologic control following antiretroviral therapy interruption in patients treated at the time of primary HIV-1 infection*. AIDS, 2010. **24**(10): p. 1598-601.
269. Saez-Cirion, A., et al., *Post-treatment HIV-1 controllers with a long-term virological remission after the interruption of early initiated antiretroviral therapy ANRS VISCONTI Study*. PLoS Pathog, 2013. **9**(3): p. e1003211.
270. Cockerham, L.R., H. Hatano, and S.G. Deeks, *Post-Treatment Controllers: Role in HIV "Cure" Research*. Curr HIV/AIDS Rep, 2016. **13**(1): p. 1-9.
271. Perreau, M., R. Banga, and G. Pantaleo, *Targeted Immune Interventions for an HIV-1 Cure*. Trends Mol Med, 2017. **23**(10): p. 945-961.
272. Mousseau, G., et al., *The Tat Inhibitor Didehydro-Cortistatin A Prevents HIV-1 Reactivation from Latency*. MBio, 2015. **6**(4): p. e00465.
273. Kessing, C.F., et al., *In Vivo Suppression of HIV Rebound by Didehydro-Cortistatin A, a "Block-and-Lock" Strategy for HIV-1 Treatment*. Cell Rep, 2017. **21**(3): p. 600-611.
274. Caskey, M., F. Klein, and M.C. Nussenzweig, *Broadly Neutralizing Antibodies for HIV-1 Prevention or Immunotherapy*. N Engl J Med, 2016. **375**(21): p. 2019-2021.
275. Gautam, R., et al., *A single injection of anti-HIV-1 antibodies protects against repeated SHIV challenges*. Nature, 2016. **533**(7601): p. 105-109.
276. Nishimura, Y., et al., *Early antibody therapy can induce long-lasting immunity to SHIV*. Nature, 2017. **543**(7646): p. 559-563.
277. Bar, K.J., et al., *Effect of HIV Antibody VRC01 on Viral Rebound after Treatment Interruption*. N Engl J Med, 2016. **375**(21): p. 2037-2050.
278. Scheid, J.F., et al., *HIV-1 antibody 3BNC117 suppresses viral rebound in humans during treatment interruption*. Nature, 2016. **535**(7613): p. 556-60.
279. Kuhlmann, A.S., C.W. Peterson, and H.P. Kiem, *Chimeric antigen receptor T-cell approaches to HIV cure*. Curr Opin HIV AIDS, 2018. **13**(5): p. 446-453.
280. Liu, B., et al., *Chimeric Antigen Receptor T Cells Guided by the Single-Chain Fv of a Broadly Neutralizing Antibody Specifically and Effectively Eradicate Virus Reactivated from Latency in CD4+ T Lymphocytes Isolated from HIV-1-Infected Individuals Receiving Suppressive Combined Antiretroviral Therapy*. J Virol, 2016. **90**(21): p. 9712-9724.
281. Hale, M., et al., *Engineering HIV-Resistant, Anti-HIV Chimeric Antigen Receptor T Cells*. Mol Ther, 2017. **25**(3): p. 570-579.

282. Borducchi, E.N., et al., *Ad26/MVA therapeutic vaccination with TLR7 stimulation in SIV-infected rhesus monkeys*. *Nature*, 2016. **540**(7632): p. 284-287.
283. Stephenson, K.E., et al., *First-in-human randomized controlled trial of an oral, replicating adenovirus 26 vector vaccine for HIV-1*. *PLoS One*, 2018. **13**(11): p. e0205139.
284. Barouch, D.H., et al., *Evaluation of a mosaic HIV-1 vaccine in a multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 1/2a clinical trial (APPROACH) and in rhesus monkeys (NHP 13-19)*. *Lancet*, 2018. **392**(10143): p. 232-243.
285. Wherry, E.J., *T cell exhaustion*. *Nat Immunol*, 2011. **12**(6): p. 492-9.
286. Trautmann, L., et al., *Upregulation of PD-1 expression on HIV-specific CD8+ T cells leads to reversible immune dysfunction*. *Nat Med*, 2006. **12**(10): p. 1198-202.
287. Porichis, F., et al., *Responsiveness of HIV-specific CD4 T cells to PD-1 blockade*. *Blood*, 2011. **118**(4): p. 965-74.
288. Fromentin, R., et al., *CD4+ T Cells Expressing PD-1, TIGIT and LAG-3 Contribute to HIV Persistence during ART*. *PLoS Pathog*, 2016. **12**(7): p. e1005761.
289. Pardons, M., et al., *Single-cell characterization and quantification of translation-competent viral reservoirs in treated and untreated HIV infection*. *PLoS Pathog*, 2019. **15**(2): p. e1007619.
290. Fromentin, R., et al., *PD-1 blockade potentiates HIV latency reversal ex vivo in CD4(+) T cells from ART-suppressed individuals*. *Nat Commun*, 2019. **10**(1): p. 814.
291. Cook, M.R. and C. Kim, *Safety and Efficacy of Immune Checkpoint Inhibitor Therapy in Patients With HIV Infection and Advanced-Stage Cancer: A Systematic Review*. *JAMA Oncol*, 2019.
292. Evans, V.A., et al., *Programmed cell death-1 contributes to the establishment and maintenance of HIV-1 latency*. *AIDS*, 2018. **32**(11): p. 1491-1497.
293. Hill, A.L., et al., *Predicting the outcomes of treatment to eradicate the latent reservoir for HIV-1*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2014. **111**(37): p. 13475-80.
294. Prins, J.M., et al., *Immuno-activation with anti-CD3 and recombinant human IL-2 in HIV-1-infected patients on potent antiretroviral therapy*. *AIDS*, 1999. **13**(17): p. 2405-10.
295. Archin, N.M., et al., *Expression of latent human immunodeficiency type 1 is induced by novel and selective histone deacetylase inhibitors*. *AIDS*, 2009. **23**(14): p. 1799-806.
296. Wei, D.G., et al., *Histone deacetylase inhibitor romidepsin induces HIV expression in CD4 T cells from patients on suppressive antiretroviral therapy at concentrations achieved by clinical dosing*. *PLoS Pathog*, 2014. **10**(4): p. e1004071.
297. Tsai, P., et al., *In vivo analysis of the effect of panobinostat on cell-associated HIV RNA and DNA levels and latent HIV infection*. *Retrovirology*, 2016. **13**(1): p. 36.
298. Williams, S.A., et al., *Prostratin antagonizes HIV latency by activating NF-kappaB*. *J Biol Chem*, 2004. **279**(40): p. 42008-17.
299. Spina, C.A., et al., *An in-depth comparison of latent HIV-1 reactivation in multiple cell model systems and resting CD4+ T cells from aviremic patients*. *PLoS Pathog*, 2013. **9**(12): p. e1003834.
300. Bullen, C.K., et al., *New ex vivo approaches distinguish effective and ineffective single agents for reversing HIV-1 latency in vivo*. *Nat Med*, 2014. **20**(4): p. 425-9.
301. Jiang, G., et al., *Synergistic Reactivation of Latent HIV Expression by Ingenol-3-Angelate, PEP005, Targeted NF-kB Signaling in Combination with JQ1 Induced p-TEFb Activation*. *PLoS Pathog*, 2015. **11**(7): p. e1005066.
302. Budhiraja, S. and A.P. Rice, *Reactivation of latent HIV: do all roads go through P-TEFb?* *Future Virol*, 2013. **8**(7).
303. Bartholomeeusen, K., et al., *Histone deacetylase inhibitors (HDACis) that release the positive transcription elongation factor b (P-TEFb) from its inhibitory complex also activate HIV transcription*. *J Biol Chem*, 2013. **288**(20): p. 14400-7.
304. Fujinaga, K., et al., *Visualization of positive transcription elongation factor b (P-TEFb) activation in living cells*. *J Biol Chem*, 2015. **290**(3): p. 1829-36.

305. Darcis, G., et al., *An In-Depth Comparison of Latency-Reversing Agent Combinations in Various In Vitro and Ex Vivo HIV-1 Latency Models Identified Bryostatin-1+JQ1 and Ingenol-B+JQ1 to Potently Reactivate Viral Gene Expression*. PLoS Pathog, 2015. **11**(7): p. e1005063.
306. Laird, G.M., et al., *Ex vivo analysis identifies effective HIV-1 latency-reversing drug combinations*. J Clin Invest, 2015. **125**(5): p. 1901-12.
307. Martinez-Bonet, M., et al., *Synergistic Activation of Latent HIV-1 Expression by Novel Histone Deacetylase Inhibitors and Bryostatin-1*. Sci Rep, 2015. **5**: p. 16445.
308. Spivak, A.M. and V. Planelles, *Novel Latency Reversal Agents for HIV-1 Cure*. Annu Rev Med, 2018. **69**: p. 421-436.
309. Darcis, G., A.T. Das, and B. Berkhout, *Tackling HIV Persistence: Pharmacological versus CRISPR-Based Shock Strategies*. Viruses, 2018. **10**(4).
310. Madhusudan, S., et al., *A multicentre phase II trial of bryostatin-1 in patients with advanced renal cancer*. Br J Cancer, 2003. **89**(8): p. 1418-22.
311. Prendiville, J., et al., *A phase I study of intravenous bryostatin 1 in patients with advanced cancer*. Br J Cancer, 1993. **68**(2): p. 418-24.
312. Grant, S., et al., *Phase Ib trial of bryostatin 1 in patients with refractory malignancies*. Clin Cancer Res, 1998. **4**(3): p. 611-8.
313. Weitman, S., et al., *A Phase I trial of bryostatin-1 in children with refractory solid tumors: a Pediatric Oncology Group study*. Clin Cancer Res, 1999. **5**(9): p. 2344-8.
314. Fulda, S., *Promises and Challenges of Smac Mimetics as Cancer Therapeutics*. Clin Cancer Res, 2015. **21**(22): p. 5030-6.
315. Gavin C. Sampey, D.M.I., Edward P. Browne, Matthew Kanke, Alecia B. McAllister, Robert G. Ferris, Jessica H. Brehm, David Favre, Jean-Pierre Routy, Corbin D. Jones, Nancie M. Archin, David M. Margolis, Richard M. Dunham, *The SMAC Mimetic AZD5582 is a Potent HIV Latency Reversing Agent*. bioRxiv, 2018.
316. Pache, L., et al., *BIRC2/cIAP1 Is a Negative Regulator of HIV-1 Transcription and Can Be Targeted by Smac Mimetics to Promote Reversal of Viral Latency*. Cell Host Microbe, 2015. **18**(3): p. 345-53.
317. Mavigner, M.D., RM.; Brooks,A.; Galardi,C.; Sampey,GC.; Bosinger,SE.; Vanderford,T.; Margolis,DM.; Silvestri,G.; Chahroudi,A. *TARGETING THE NONCANONICAL NF-κB PATHWAY REVERSES SIV LATENCY*. in CROI. 2019. Seattle, Washington.
318. Hattori, S.I., et al., *Combination of a Latency-Reversing Agent With a Smac Mimetic Minimizes Secondary HIV-1 Infection in vitro*. Front Microbiol, 2018. **9**: p. 2022.
319. Archin, N.M., et al., *Antiretroviral intensification and valproic acid lack sustained effect on residual HIV-1 viremia or resting CD4+ cell infection*. PLoS One, 2010. **5**(2): p. e9390.
320. Archin, N.M., et al., *Valproic acid without intensified antiviral therapy has limited impact on persistent HIV infection of resting CD4+ T cells*. AIDS, 2008. **22**(10): p. 1131-5.
321. Routy, J.P., et al., *Valproic acid in association with highly active antiretroviral therapy for reducing systemic HIV-1 reservoirs: results from a multicentre randomized clinical study*. HIV Med, 2012. **13**(5): p. 291-6.
322. Sagot-Lerolle, N., et al., *Prolonged valproic acid treatment does not reduce the size of latent HIV reservoir*. AIDS, 2008. **22**(10): p. 1125-9.
323. Siliciano, J.D., et al., *Stability of the latent reservoir for HIV-1 in patients receiving valproic acid*. J Infect Dis, 2007. **195**(6): p. 833-6.
324. Elliott, J.H., et al., *Activation of HIV transcription with short-course vorinostat in HIV-infected patients on suppressive antiretroviral therapy*. PLoS Pathog, 2014. **10**(10): p. e1004473.
325. Archin, N.M., et al., *Interval dosing with the HDAC inhibitor vorinostat effectively reverses HIV latency*. J Clin Invest, 2017. **127**(8): p. 3126-3135.
326. Archin, N.M., et al., *Administration of vorinostat disrupts HIV-1 latency in patients on antiretroviral therapy*. Nature, 2012. **487**(7408): p. 482-5.

327. Rasmussen, T.A., et al., *Panobinostat, a histone deacetylase inhibitor, for latent-virus reactivation in HIV-infected patients on suppressive antiretroviral therapy: a phase 1/2, single group, clinical trial*. *Lancet HIV*, 2014. **1**(1): p. e13-21.
328. Sogaard, O.S., et al., *The Depsipeptide Romidepsin Reverses HIV-1 Latency In Vivo*. *PLoS Pathog*, 2015. **11**(9): p. e1005142.
329. Gutierrez, C., et al., *Bryostatin-1 for latent virus reactivation in HIV-infected patients on antiretroviral therapy*. *AIDS*, 2016. **30**(9): p. 1385-92.
330. Jiang, G., et al., *Disruption of latent HIV in vivo during the clearance of actinic keratosis by ingenol mebutate*. *JCI Insight*, 2019. **4**(7).
331. Delagreverie, H.M., et al., *Ongoing Clinical Trials of Human Immunodeficiency Virus Latency-Reversing and Immunomodulatory Agents*. *Open Forum Infect Dis*, 2016. **3**(4): p. ofw189.
332. Sengupta, S. and R.F. Siliciano, *Targeting the Latent Reservoir for HIV-1*. *Immunity*, 2018. **48**(5): p. 872-895.
333. Suraweera, A., K.J. O'Byrne, and D.J. Richard, *Combination Therapy With Histone Deacetylase Inhibitors (HDACi) for the Treatment of Cancer: Achieving the Full Therapeutic Potential of HDACi*. *Front Oncol*, 2018. **8**: p. 92.
334. Khaitan, A. and D. Unutmaz, *Revisiting immune exhaustion during HIV infection*. *Curr HIV/AIDS Rep*, 2011. **8**(1): p. 4-11.
335. Yamamoto, T., et al., *Surface expression patterns of negative regulatory molecules identify determinants of virus-specific CD8+ T-cell exhaustion in HIV infection*. *Blood*, 2011. **117**(18): p. 4805-15.
336. Chew, G.M., et al., *TIGIT Marks Exhausted T Cells, Correlates with Disease Progression, and Serves as a Target for Immune Restoration in HIV and SIV Infection*. *PLoS Pathog*, 2016. **12**(1): p. e1005349.
337. Lempicki, R.A., et al., *Impact of HIV-1 infection and highly active antiretroviral therapy on the kinetics of CD4+ and CD8+ T cell turnover in HIV-infected patients*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000. **97**(25): p. 13778-83.
338. Mollet, L., et al., *Dynamics of HIV-specific CD8+ T lymphocytes with changes in viral load. The RESTIM and COMET Study Groups*. *J Immunol*, 2000. **165**(3): p. 1692-704.
339. Clutton, G.T. and R.B. Jones, *Diverse Impacts of HIV Latency-Reversing Agents on CD8+ T-Cell Function: Implications for HIV Cure*. *Front Immunol*, 2018. **9**: p. 1452.
340. Jones, R.B., et al., *Histone deacetylase inhibitors impair the elimination of HIV-infected cells by cytotoxic T-lymphocytes*. *PLoS Pathog*, 2014. **10**(8): p. e1004287.
341. Desimio, M.G., et al., *In Vitro Exposure to Prostratin but Not Bryostatin-1 Improves Natural Killer Cell Functions Including Killing of CD4(+) T Cells Harboring Reactivated Human Immunodeficiency Virus*. *Front Immunol*, 2018. **9**: p. 1514.
342. Huang, S.H., et al., *Latent HIV reservoirs exhibit inherent resistance to elimination by CD8+ T cells*. *J Clin Invest*, 2018. **128**(2): p. 876-889.
343. Kyei, G.B., et al., *Splicing Factor 3B Subunit 1 Interacts with HIV Tat and Plays a Role in Viral Transcription and Reactivation from Latency*. *MBio*, 2018. **9**(6).
344. Vargas, B., et al., *Inhibitors of Signaling Pathways That Block Reversal of HIV-1 Latency*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2019. **63**(2).
345. Zhang, H.S., et al., *UTX-1 regulates Tat-induced HIV-1 transactivation via changing the methylated status of histone H3*. *Int J Biochem Cell Biol*, 2016. **80**: p. 51-56.
346. Mediouni, S., et al., *Didehydro-cortistatin A inhibits HIV-1 Tat mediated neuroinflammation and prevents potentiation of cocaine reward in Tat transgenic mice*. *Curr HIV Res*, 2015. **13**(1): p. 64-79.
347. Laird, G.M., et al., *Rapid quantification of the latent reservoir for HIV-1 using a viral outgrowth assay*. *PLoS Pathog*, 2013. **9**(5): p. e1003398.
348. Eriksson, S., et al., *Comparative analysis of measures of viral reservoirs in HIV-1 eradication studies*. *PLoS Pathog*, 2013. **9**(2): p. e1003174.
349. Ho, Y.C., et al., *Replication-competent noninduced proviruses in the latent reservoir increase barrier to HIV-1 cure*. *Cell*, 2013. **155**(3): p. 540-51.

350. Rosenbloom, D.I.S., et al., *Assessing intra-lab precision and inter-lab repeatability of outgrowth assays of HIV-1 latent reservoir size*. PLoS Comput Biol, 2019. **15**(4): p. e1006849.
351. Plantin, J., M. Massanella, and N. Chomont, *Inducible HIV RNA transcription assays to measure HIV persistence: pros and cons of a compromise*. Retrovirology, 2018. **15**(1): p. 9.
352. Pasternak, A.O. and B. Berkhout, *What do we measure when we measure cell-associated HIV RNA*. Retrovirology, 2018. **15**(1): p. 13.
353. Massanella, M., et al., *Improved assays to measure and characterize the inducible HIV reservoir*. EBioMedicine, 2018. **36**: p. 113-121.
354. Cillo, A.R., et al., *Quantification of HIV-1 latency reversal in resting CD4+ T cells from patients on suppressive antiretroviral therapy*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2014. **111**(19): p. 7078-83.
355. Pasternak, A.O., et al., *Minor Contribution of Chimeric Host-HIV Readthrough Transcripts to the Level of HIV Cell-Associated gag RNA*. J Virol, 2016. **90**(2): p. 1148-51.
356. Moron-Lopez, S., et al., *Characterization of the HIV-1 transcription profile after romidepsin administration in ART-suppressed individuals*. AIDS, 2019. **33**(3): p. 425-431.
357. Yukl, S.A., et al., *HIV latency in isolated patient CD4(+) T cells may be due to blocks in HIV transcriptional elongation, completion, and splicing*. Sci Transl Med, 2018. **10**(430).
358. Procopio, F.A., et al., *A Novel Assay to Measure the Magnitude of the Inducible Viral Reservoir in HIV-infected Individuals*. EBioMedicine, 2015. **2**(8): p. 874-83.
359. Gadol, N., G.J. Crutcher, and M.P. Busch, *Detection of intracellular HIV in lymphocytes by flow cytometry*. Cytometry, 1994. **15**(4): p. 359-70.
360. Kux, A., et al., *Antibodies to p24 antigen do not specifically detect HIV-infected lymphocytes in AIDS patients*. J Immunol Methods, 1996. **191**(2): p. 179-86.
361. Cameron, P.U., et al., *Specificity of binding of HIV-1 anti-p24 antibodies to CD4+ lymphocytes from HIV-infected subjects*. Cytometry, 1998. **33**(1): p. 83-8.
362. Graf, E.H., et al., *Gag-positive reservoir cells are susceptible to HIV-specific cytotoxic T lymphocyte mediated clearance in vitro and can be detected in vivo [corrected]*. PLoS One, 2013. **8**(8): p. e71879.
363. Baxter, A.E., et al., *Single-Cell Characterization of Viral Translation-Competent Reservoirs in HIV-Infected Individuals*. Cell Host Microbe, 2016. **20**(3): p. 368-380.
364. Martrus, G., et al., *Kinetics of HIV-1 Latency Reversal Quantified on the Single-Cell Level Using a Novel Flow-Based Technique*. J Virol, 2016. **90**(20): p. 9018-28.
365. Grau-Exposito, J., et al., *A Novel Single-Cell FISH-Flow Assay Identifies Effector Memory CD4(+) T cells as a Major Niche for HIV-1 Transcription in HIV-Infected Patients*. MBio, 2017. **8**(4).
366. Descours, B., et al., *CD32a is a marker of a CD4 T-cell HIV reservoir harbouring replication-competent proviruses*. Nature, 2017. **543**(7646): p. 564-567.
367. Perez, L., et al., *Conflicting evidence for HIV enrichment in CD32(+) CD4 T cells*. Nature, 2018. **561**(7723): p. E9-E16.
368. Osuna, C.E., et al., *Evidence that CD32a does not mark the HIV-1 latent reservoir*. Nature, 2018. **561**(7723): p. E20-E28.
369. Noto, A., et al., *CD32(+) and PD-1(+) Lymph Node CD4 T Cells Support Persistent HIV-1 Transcription in Treated Aviremic Individuals*. J Virol, 2018. **92**(20).
370. Bertagnolli, L.N., et al., *The role of CD32 during HIV-1 infection*. Nature, 2018. **561**(7723): p. E17-E19.
371. Badia, R., et al., *CD32 expression is associated to T-cell activation and is not a marker of the HIV-1 reservoir*. Nat Commun, 2018. **9**(1): p. 2739.
372. Abdel-Mohsen, M., et al., *CD32 is expressed on cells with transcriptionally active HIV but does not enrich for HIV DNA in resting T cells*. Sci Transl Med, 2018. **10**(437).
373. Iglesias-Ussel, M., et al., *High levels of CD2 expression identify HIV-1 latently infected resting memory CD4+ T cells in virally suppressed subjects*. J Virol, 2013. **87**(16): p. 9148-58.

374. McGary, C.S., et al., *CTLA-4(+)/PD-1(-) Memory CD4(+) T Cells Critically Contribute to Viral Persistence in Antiretroviral Therapy-Suppressed, SIV-Infected Rhesus Macaques*. *Immunity*, 2017. **47**(4): p. 776-788 e5.
375. Hogan, L.E., et al., *Increased HIV-1 transcriptional activity and infectious burden in peripheral blood and gut-associated CD4+ T cells expressing CD30*. *PLoS Pathog*, 2018. **14**(2): p. e1006856.
376. Rizzardi, G.P., et al., *Plasma levels of soluble CD30, tumour necrosis factor (TNF)-alpha and TNF receptors during primary HIV-1 infection: correlation with HIV-1 RNA and the clinical outcome*. *AIDS*, 1996. **10**(13): p. F45-50.
377. Lee, S.Y., et al., *CD30/TNF receptor-associated factor interaction: NF-kappa B activation and binding specificity*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996. **93**(18): p. 9699-703.
378. Biswas, P., et al., *Cross-linking of CD30 induces HIV expression in chronically infected T cells*. *Immunity*, 1995. **2**(6): p. 587-96.
379. Moingeon, P., et al., *CD2-mediated adhesion facilitates T lymphocyte antigen recognition function*. *Nature*, 1989. **339**(6222): p. 312-4.
380. Mocellin, S., C. Benna, and P. Pilati, *Coinhibitory molecules in cancer biology and therapy*. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2013. **24**(2): p. 147-61.
381. Ulrich, S., et al., *Therapeutic drug monitoring of clozapine and relapse--a retrospective study of routine clinical data*. *Int J Clin Pharmacol Ther*, 2003. **41**(1): p. 3-13.
382. Arthos, J., et al., *HIV-1 envelope protein binds to and signals through integrin alpha4beta7, the gut mucosal homing receptor for peripheral T cells*. *Nat Immunol*, 2008. **9**(3): p. 301-9.
383. Cicala, C., et al., *The integrin alpha4beta7 forms a complex with cell-surface CD4 and defines a T-cell subset that is highly susceptible to infection by HIV-1*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009. **106**(49): p. 20877-82.
384. Sivro, A., et al., *Integrin alpha4beta7 expression on peripheral blood CD4(+) T cells predicts HIV acquisition and disease progression outcomes*. *Sci Transl Med*, 2018. **10**(425).
385. Nawaz, F., et al., *MAdCAM costimulation through Integrin-alpha4beta7 promotes HIV replication*. *Mucosal Immunol*, 2018. **11**(5): p. 1342-1351.
386. Neidleman, J.L., X.; Xie,G.; Hoh,R. *CYTOF CHARACTERIZATION OF THE IN VIVO LATENT HIV RESERVOIR IN BLOOD AND TISSUES*. in *CROI*. 2019. Seattle, Washington.
387. van Spriel, A.B., et al., *The tetraspanin CD37 orchestrates the alpha(4)beta(1) integrin-Akt signaling axis and supports long-lived plasma cell survival*. *Sci Signal*, 2012. **5**(250): p. ra82.
388. Briskin, M., et al., *Human mucosal addressin cell adhesion molecule-1 is preferentially expressed in intestinal tract and associated lymphoid tissue*. *Am J Pathol*, 1997. **151**(1): p. 97-110.
389. Masopust, D., et al., *Dynamic T cell migration program provides resident memory within intestinal epithelium*. *J Exp Med*, 2010. **207**(3): p. 553-64.
390. Imhof, B.A. and D. Dunon, *Leukocyte migration and adhesion*. *Adv Immunol*, 1995. **58**: p. 345-416.
391. Crowell, T.A., et al., *Initiation of antiretroviral therapy before detection of colonic infiltration by HIV reduces viral reservoirs, inflammation and immune activation*. *J Int AIDS Soc*, 2016. **19**(1): p. 21163.
392. Arthos, J., et al., *The Role of Integrin alpha4beta7 in HIV Pathogenesis and Treatment*. *Curr HIV/AIDS Rep*, 2018. **15**(2): p. 127-135.
393. Jovani, M. and S. Danese, *Vedolizumab for the treatment of IBD: a selective therapeutic approach targeting pathogenic a4b7 cells*. *Curr Drug Targets*, 2013. **14**(12): p. 1433-43.
394. Uzzan, M., et al., *Anti-alpha4beta7 therapy targets lymphoid aggregates in the gastrointestinal tract of HIV-1-infected individuals*. *Sci Transl Med*, 2018. **10**(461).
395. Di Mascio, M., et al. *Evaluation of an antibody to Alpha4Beta7 in the control of SIV infection*. in *AIDS*. 2018. Amsterdam, Netherlands.
396. Kuo, L., et al., *Highlights from the Fourth Biennial Strategies for an HIV Cure Meeting, 10-12 October 2018, Bethesda, MD, USA*. *J Virus Erad*, 2019. **5**(1): p. 50-59.

397. Iwata, M., et al., *Retinoic acid imprints gut-homing specificity on T cells*. *Immunity*, 2004. **21**(4): p. 527-38.
398. Sigmundsdottir, H., et al., *DCs metabolize sunlight-induced vitamin D3 to 'program' T cell attraction to the epidermal chemokine CCL27*. *Nat Immunol*, 2007. **8**(3): p. 285-93.
399. Yednock, T.A., et al., *Prevention of experimental autoimmune encephalomyelitis by antibodies against alpha 4 beta 1 integrin*. *Nature*, 1992. **356**(6364): p. 63-6.
400. McCormack, P.L., *Natalizumab: a review of its use in the management of relapsing-remitting multiple sclerosis*. *Drugs*, 2013. **73**(13): p. 1463-81.
401. Guagnozzi, D. and R. Caprilli, *Natalizumab in the treatment of Crohn's disease*. *Biologics*, 2008. **2**(2): p. 275-84.
402. Kawamoto, E., et al., *Anti-integrin therapy for multiple sclerosis*. *Autoimmune Dis*, 2012. **2012**: p. 357101.
403. Linsley, P.S., et al., *Intracellular trafficking of CTLA-4 and focal localization towards sites of TCR engagement*. *Immunity*, 1996. **4**(6): p. 535-43.
404. Martin, G.E., et al., *CD32-Expressing CD4 T Cells Are Phenotypically Diverse and Can Contain Proviral HIV DNA*. *Front Immunol*, 2018. **9**: p. 928.
405. Jones, R.B., et al., *A Subset of Latency-Reversing Agents Expose HIV-Infected Resting CD4+ T-Cells to Recognition by Cytotoxic T-Lymphocytes*. *PLoS Pathog*, 2016. **12**(4): p. e1005545.
406. Han, K.P., et al., *IL-15:IL-15 receptor alpha superagonist complex: high-level co-expression in recombinant mammalian cells, purification and characterization*. *Cytokine*, 2011. **56**(3): p. 804-10.
407. McBrien, J.M., M.; Smith, S.A.; White, E.R.; Vanderford, T.; Estes, J.D.; Lifson, J.D.; Lee, J.H.; Safrit, J.T.; Garcia, J.V.; Paiardini, M.; Bosinger, S.E.; Derdeyn, C.; Chahroudi, A.; Silvestri, G. *N-803 INDUCES ROBUST SIV REACTIVATION IN ART-TREATED CD8-DEPLETED MACAQUES*. in *CROI*. 2019. Seattle, Washington.
408. Davis, Z.T., A.; Anderson, J.; Wong, H.C.; Karn, J.; Dobrowski, C.; Miller, J.S.; Cooley, S.; Douek, D.; Schacker, T. *A PHASE 1 STUDY OF ALT-803 (IL-15 SUPERAGONIST) TO CLEAR LATENT HIV RESERVOIRS*. in *CROI*. 2018. Boston, Massachusetts.
409. Lodolce, J., et al., *Interleukin-15 and the regulation of lymphoid homeostasis*. *Mol Immunol*, 2002. **39**(9): p. 537-44.
410. Webb, G.M., et al., *The human IL-15 superagonist ALT-803 directs SIV-specific CD8(+) T cells into B-cell follicles*. *Blood Adv*, 2018. **2**(2): p. 76-84.
411. Mueller, Y.M., et al., *IL-15 enhances survival and function of HIV-specific CD8+ T cells*. *Blood*, 2003. **101**(3): p. 1024-9.
412. Golumbeanu, M., et al., *Single-Cell RNA-Seq Reveals Transcriptional Heterogeneity in Latent and Reactivated HIV-Infected Cells*. *Cell Rep*, 2018. **23**(4): p. 942-950.
413. Fos, C., et al., *ICOS ligation recruits the p50alpha PI3K regulatory subunit to the immunological synapse*. *J Immunol*, 2008. **181**(3): p. 1969-77.
414. Maazi, H., et al., *ICOS:ICOS-ligand interaction is required for type 2 innate lymphoid cell function, homeostasis, and induction of airway hyperreactivity*. *Immunity*, 2015. **42**(3): p. 538-51.
415. Stevenson, M., et al., *HIV-1 replication is controlled at the level of T cell activation and proviral integration*. *EMBO J*, 1990. **9**(5): p. 1551-60.
416. Hutloff, A., et al., *ICOS is an inducible T-cell co-stimulator structurally and functionally related to CD28*. *Nature*, 1999. **397**(6716): p. 263-6.
417. Doyon, G., et al., *Discovery of a small molecule agonist of phosphatidylinositol 3-kinase p110alpha that reactivates latent HIV-1*. *PLoS One*, 2014. **9**(1): p. e84964.
418. Zheng, B.X., G.; Chen, X.; Marinova, E.; Han, S., *ICOSL-mediated signaling is essential for the survival and functional maturation of germinal center B cells through the classical NF-kB pathway*. *J Immunol* 2015. **194**.

419. Herndler-Brandstetter, D., et al., *Human bone marrow hosts polyfunctional memory CD4+ and CD8+ T cells with close contact to IL-15-producing cells*. J Immunol, 2011. **186**(12): p. 6965-71.
420. Ramesh, R., et al., *Pro-inflammatory human Th17 cells selectively express P-glycoprotein and are refractory to glucocorticoids*. J Exp Med, 2014. **211**(1): p. 89-104.
421. Planas, D., et al., *HIV-1 selectively targets gut-homing CCR6+CD4+ T cells via mTOR-dependent mechanisms*. JCI Insight, 2017. **2**(15).
422. Hiener, B., et al., *Amplification of Near Full-length HIV-1 Proviruses for Next-Generation Sequencing*. J Vis Exp, 2018(140).
423. Hotter, D., et al., *IFI16 Targets the Transcription Factor Sp1 to Suppress HIV-1 Transcription and Latency Reactivation*. Cell Host Microbe, 2019. **25**(6): p. 858-872 e13.
424. Bradley, T., et al., *Single-Cell Analysis of Quiescent HIV Infection Reveals Host Transcriptional Profiles that Regulate Proviral Latency*. Cell Rep, 2018. **25**(1): p. 107-117 e3.
425. Cohn, L.B., et al., *Clonal CD4(+) T cells in the HIV-1 latent reservoir display a distinct gene profile upon reactivation*. Nat Med, 2018. **24**(5): p. 604-609.
426. Abdelwahab, S.F., et al., *HIV-1-suppressive factors are secreted by CD4+ T cells during primary immune responses*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(25): p. 15006-10.
427. Kaczmarek Michaels, K., et al., *Blimp-1, an intrinsic factor that represses HIV-1 proviral transcription in memory CD4+ T cells*. J Immunol, 2015. **194**(7): p. 3267-74.
428. Ho, Y.-C. *THE POWER OF THE HIV PROMOTER: IMPACT OF HIV-DRIVEN VIRAL AND HOST GENE EXPRESSION*. in CROI. 2019. Seattle, Washington.
429. Einkauf, K.B., et al., *Intact HIV-1 proviruses accumulate at distinct chromosomal positions during prolonged antiretroviral therapy*. J Clin Invest, 2019. **129**(3): p. 988-998.
430. Frauwirth, K.A. and C.B. Thompson, *Regulation of T lymphocyte metabolism*. J Immunol, 2004. **172**(8): p. 4661-5.
431. Palmer, C.S., et al., *Exploiting immune cell metabolic machinery for functional HIV cure and the prevention of inflammaging*. F1000Res, 2018. **7**: p. 125.
432. Loisel-Meyer, S., et al., *Glut1-mediated glucose transport regulates HIV infection*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. **109**(7): p. 2549-54.
433. Palmer, C.S., et al., *Metabolically active CD4+ T cells expressing Glut1 and OX40 preferentially harbor HIV during in vitro infection*. FEBS Lett, 2017. **591**(20): p. 3319-3332.
434. Valle-Casuso, J.C., et al., *Cellular Metabolism Is a Major Determinant of HIV-1 Reservoir Seeding in CD4(+) T Cells and Offers an Opportunity to Tackle Infection*. Cell Metab, 2019. **29**(3): p. 611-626 e5.
435. Cacciatore, S., et al., *Metabolic Profiling in Formalin-Fixed and Paraffin-Embedded Prostate Cancer Tissues*. Mol Cancer Res, 2017. **15**(4): p. 439-447.
436. Oestreich, K.J., et al., *Bcl-6 directly represses the gene program of the glycolysis pathway*. Nat Immunol, 2014. **15**(10): p. 957-64.
437. Patsoukis, N., et al., *PD-1 alters T-cell metabolic reprogramming by inhibiting glycolysis and promoting lipolysis and fatty acid oxidation*. Nat Commun, 2015. **6**: p. 6692.