

Université de Montréal

Caractérisation génotypique des réservoirs viraux qui persistent chez les personnes vivant avec le VIH sous traitement antirétroviral.

Par

Caroline Dufour

Département de microbiologie, infectiologie et immunologie, Faculté de médecine

Thèse présentée en vue de l'obtention du grade de Philosophiæ Doctor (Ph.D)

en Virologie & Immunologie

Mai 2023

© Caroline Dufour, 2023

Université de Montréal

Unité académique : département de microbiologie, infectiologie et immunologie, Faculté de
médecine

Cette thèse intitulée

**Caractérisation génotypique des réservoirs viraux qui persistent chez les personnes vivant
avec le VIH sous traitement antirétroviral.**

Présentée par

Caroline Dufour

A été évaluée par un jury composé des personnes suivantes

Dr Soren Gantt

Président-rapporteur

Pr Nicolas Chomont

Directeur de recherche

Dr Simon Grandjean-Lapierre

Membre du jury

Pr Angela Ciuffi

Examinatrice externe

Résumé

Les personnes qui vivent avec le VIH (PVVIH) doivent prendre un traitement d'antirétroviraux combinés (ART) pour contrôler la réplication virale et empêcher le développement d'une immunodéficience dont l'issue est fatale. Les ART protègent les cellules saines de l'infection et permettent ainsi de rendre la charge virale plasmatique indétectable. Cependant, l'arrêt des ART entraîne presque inévitablement un rebond de la charge virale, puisque le virus n'est jamais complètement éliminé par le système immunitaire. En effet, de multiples cellules infectées, où le virus s'est intégré et demeure dans un état de latence, restent présentes tout au long de la vie des PVVIH. Une partie de ces cellules infectées forme le réservoir compétent pour la réplication. Les provirus responsables du rebond de la charge virale possèdent trois caractéristiques : ils gardent la capacité d'être réactivés (sortie de latence), ils sont génétiquement intacts, et ils peuvent produire de nouvelles particules virales infectieuses. Afin de guérir les PVVIH de l'infection, il faut donc cibler les quelques rares cellules portant un provirus intact et inductible. Pour ce faire, il est impératif de comprendre comment ces cellules sont maintenues pendant les années de ART, de les localiser dans tout l'organisme, et d'identifier ce qui peut les distinguer des autres. Ce sont ces trois aspects que nous avons abordés au cours des travaux de recherche présentés dans cette thèse, autant à l'échelle de la cellule unique que de l'organisme entier. Nos résultats montrent que les provirus compétents pour la réplication persistent dans des lymphocytes T CD4+ mémoires exprimant l'intégrine VLA-4 en grande quantité, que les provirus intacts peuvent subsister au sein de différents compartiments anatomiques, que les provirus inductibles et compétents pour la traduction de la protéine virale p24 sont majoritairement défectifs, et que l'expansion clonale est un mécanisme important qui favorise le maintien du réservoir viral dans le sang et dans les tissus tout en favorisant la diversité phénotypique de ces cellules.

Mots-clés : Réservoir, VIH, latence, séquençage quasi complet, phénotype, VLA-4, HIV-Flow, expansion clonale, inductibilité, réservoir compétent pour la réplication, réservoirs anatomiques, compartimentalisation, *post mortem*, autopsies

Abstract

People with HIV (PWH) must take combinational antiretroviral therapy (ART) to control viral replication and avoid developing fatal immunodeficiency. ART allows achieving undetectable plasma viral load, and thus protects uninfected cells from HIV. However, ART interruption will almost inevitably result in a viral rebound since HIV is never completely cleared by the immune system. Indeed, a group of infected cells, where the virus has integrated and remains in a latent state, persists throughout the life course of PWH, and some of these cells form the replication-competent reservoir. Proviruses responsible for viral rebound have three characteristics: they can be induced to exit their latent state, they are genetically intact, and they are able to produce new infectious viral particles. Therefore, in order to cure PWH, it is essential to target the few cells with intact and inducible provirus, and to be able to do so, it is imperative to understand how these cells are maintained during years of ART, to localize them throughout the body, and to identify what distinguishes them from other cells. These three aspects are the focus of the work presented in this thesis, whether at the single-cell level or looking through the whole body. Our results show that replication-competent proviruses persist in memory CD4⁺ T cells expressing high levels of the integrin VLA-4, that intact proviruses can persist among various anatomical compartments, that inducible and translation-competent proviruses are predominantly defective, and that clonal expansion is an important mechanism that favors the maintenance of reservoir cells both in the blood and in deep tissues in addition to diversify phenotypically those cells.

Keywords: HIV, reservoir, latency, near full-length sequencing, phenotype, HIV-Flow, VLA-4, clonal expansion, inducibility, replication-competent reservoir, anatomical reservoirs, compartmentalization, *postmortem*, autopsies

Résumé de vulgarisation

Une personne vivant avec le virus de l'immunodéficience humaine, aussi connu sous le nom de VIH, doit prendre des traitements toute sa vie, puisqu'il n'existe actuellement aucun moyen de guérir de cette infection. Les traitements antirétroviraux empêchent les virus actifs d'infecter des cellules saines, en contre-carrant la production de nouveaux virus. Toutefois, le VIH a la capacité peu commune de se cacher de façon permanente dans la cellule qu'il infecte. En restant dans cet état de latence, il est invisible au système immunitaire et n'est donc pas éliminé. Dans les faits, seule une petite partie des virus latents sont capables de sortir de leur latence si les traitements antirétroviraux sont interrompus : on assiste alors au rebond de la charge virale. Ce sont ces quelques cellules infectées avec un virus capable de se réactiver et de produire des particules virales infectieuses qui forcent la prise de médicaments à vie, et qui sont appelées le réservoir du VIH.

Pour développer des traitements curatifs, il est important de mieux identifier ces réservoirs. Notre but était d'identifier les virus de VIH exempts de défauts (provirus intacts), capables de sortir de leur cachette (provirus inductibles) et de produire des particules virales infectieuses (provirus compétents pour la réplication).

Bien que nous n'ayons obtenu qu'une image partielle des réservoirs du VIH présents chez les personnes vivant avec le virus et qui prennent des traitements antirétroviraux depuis des années, nos travaux apportent un éclairage nouveau sur ces réservoirs. Tout d'abord, nous avons observé que les provirus intacts sont rares, mais qu'ils peuvent être retrouvés dans différents organes du corps humain. Ensuite, nous avons constaté que beaucoup de cellules portant un virus latent se multiplient au fil du temps, ce qui permet de maintenir le VIH dans l'organisme pendant des années. Finalement, le réservoir du VIH est surtout présent dans un type cellulaire, les lymphocytes T CD4+ mémoires, qui ont à leur surface une protéine en grande quantité, l'intégrine VLA-4. Ces informations améliorent notre connaissance des réservoirs et permettront de mieux les cibler afin de pouvoir ultimement les éradiquer.

Table des matières

| | |
|--|----|
| Résumé | 5 |
| Abstract..... | 7 |
| Résumé de vulgarisation..... | 8 |
| Table des matières..... | 9 |
| Liste des tableaux | 19 |
| Liste des figures | 21 |
| Liste des sigles et abréviations..... | 23 |
| Remerciements..... | 31 |
| Avant-propos | 33 |
| Chapitre 1 – Introduction..... | 34 |
| 1.1. Le VIH/SIDA..... | 34 |
| 1.1.1. Découverte..... | 34 |
| 1.1.2. Début des antirétroviraux..... | 34 |
| 1.1.3. Taxonomie et définition..... | 36 |
| 1.1.4. Tropisme | 36 |
| 1.1.5. Génome viral..... | 37 |
| 1.1.5.1. Gènes de protéines de structure et d’enzymes | 37 |
| 1.1.5.2. Gènes de protéines régulatrices et accessoires..... | 38 |
| 1.1.5.3. LTRs | 39 |
| 1.1.6. Cycle viral : De l’infection à la production de virions | 40 |
| 1.1.7. Transcription du VIH | 42 |
| 1.2. Pathogenèse | 44 |

| | |
|--|----|
| 1.2.1. Mode de transmission | 44 |
| 1.2.2. Phase aigüe, ou la primo-infection | 44 |
| 1.2.2.1. Stades Fiebig | 45 |
| 1.2.2.2. Prophylaxie post-exposition..... | 46 |
| 1.2.3. Phase chronique de l'infection..... | 47 |
| 1.2.3.1. Phase chronique cliniquement asymptomatique | 47 |
| 1.2.3.2. Phase chronique symptomatique ou SIDA..... | 47 |
| 1.2.3.3. Activation immunitaire chronique | 48 |
| 1.2.3.4. Épuisement immunitaire..... | 48 |
| 1.3. Contrôle de la virémie..... | 50 |
| 1.3.1. Les thérapies pharmacologiques actuelles : les antirétroviraux..... | 50 |
| 1.3.2. Les thérapies en développement..... | 52 |
| 1.3.2.1. Le « shock and kill », pour purger les réservoirs | 53 |
| 1.3.2.2. Le « block and lock », inactiver le VIH de façon permanente | 56 |
| 1.3.2.3. Les vaccins thérapeutiques et les anticorps neutralisants à large spectre | 57 |
| 1.3.3. Contrôleurs | 58 |
| 1.3.3.1. Contrôleurs élités..... | 59 |
| 1.3.3.2. Contrôleurs post-traitements | 59 |
| 1.3.4. Greffe de cellules souches hématopoïétiques CCR5Δ32 | 60 |
| 1.3.5. Rémission naturelle | 61 |
| 1.4. Réservoir viral | 63 |
| 1.4.1. Définition du réservoir | 63 |
| 1.4.1.1. Persistance | 63 |
| 1.4.1.2. Latence..... | 64 |

| | |
|--|----|
| 1.4.1.3. Intégrité du réservoir | 65 |
| 1.4.1.4. Réactivation | 67 |
| 1.4.2. Réservoir anatomique..... | 68 |
| 1.4.2.1. Tissus et organes qui constituent le réservoir | 68 |
| 1.4.2.2. Sanctuaires et compartimentalisation | 69 |
| 1.4.2.3. Importance des autopsies..... | 71 |
| 1.4.3. Mécanisme de persistance | 72 |
| 1.4.3.1. Homéostasie | 72 |
| 1.4.3.2. Expansion clonale..... | 73 |
| 1.4.3.3. Virémie résiduelle et possibilité d'une réplication résiduelle | 74 |
| 1.4.4. Caractérisation des réservoirs..... | 75 |
| 1.4.4.1. Mesures quantitatives | 76 |
| 1.4.4.1.1 Quantification par PCR : ADN et ARN viraux | 77 |
| 1.4.4.1.2. Quantification par culture cellulaire : qVOA | 79 |
| 1.4.4.1.3. Quantifier l'intégrité du génome viral : séquençage et approches PCR | 80 |
| 1.4.4.1.4. Quantifier l'inductibilité du réservoir : approches PCR et cytométrie en flux | 83 |
| 1.4.4.2. Mesures qualitatives : caractérisation phénotypique des cellules réservoirs | 85 |
| 1.4.4.2.1. Phénotyper les réservoirs compétents pour la traduction : HIV Flow | 88 |
| 1.4.4.2.2 Phénotyper les réservoirs compétents pour la transcription : RNA Flow Fish | 90 |
| 1.4.4.2.3. Phénotyper des cellules infectées qui persistent en fonction de leur transcriptome | 92 |
| 1.4.4.2.4. Évaluer la clonalité des réservoirs : séquençages du VIH (sous-génomique ou NFL), des sites d'intégration, des TCR..... | 94 |

| | |
|---|-----|
| 1.4.4.3. Mesures combinées du réservoir..... | 99 |
| 1.4.4.3.1 Combinaison de mesures avec une étape de tri cellulaire par cytométrie en flux | 102 |
| 1.4.4.3.2 Combinaison de mesures incluant une étape initiale d'amplification du génome complet (WGA) | 103 |
| 1.4.4.3.3 Méthodes combinées de mesures avec partition par microfluidique | 106 |
| 1.5. Objectifs de la thèse de recherche | 111 |
| Chapitre 2 – Caractérisation phénotypique de cellules T CD4+ individuelles dans lesquelles persistent les génomes de VIH génétiquement intacts et inductibles | 115 |
| 2.1. Aperçu du projet | 115 |
| 2.1.1. Contexte et hypothèse..... | 115 |
| 2.1.2. Objectif..... | 115 |
| 2.1.3. Statut de l'article..... | 116 |
| 2.1.4. Contribution détaillée de chacun des auteurs | 116 |
| 2.1.5. Résumé | 116 |
| 2.2. Article #1: Phenotypic characterization of single CD4+ T cells harboring genetically intact and inducible HIV genomes | 118 |
| Abstract..... | 119 |
| Introduction | 120 |
| Results..... | 122 |
| Combined phenotypic and genotypic analysis of the inducible and translation-competent reservoir..... | 122 |
| The inducible and translation-competent reservoir is highly clonal..... | 123 |
| Clonally-expanded inducible proviruses are found in phenotypically different cells | 123 |

| | |
|---|-----|
| Inducible and translation-competent proviruses display distinct defects compared to non-induced proviruses..... | 124 |
| p24+ cells with intact proviral genomes express high levels of the integrin $\alpha 4\beta 1$ | 126 |
| $\alpha 4\beta 1$ enriches in CD4+ T cells with intact and replication-competent proviruses..... | 127 |
| Discussion | 129 |
| Methods..... | 133 |
| Study design..... | 133 |
| HIV reservoir quantifications | 133 |
| HIV-Flow staining | 133 |
| Cell sorting of p24- and p24+ cells | 134 |
| Single-amplicon NFL nested PCR amplification..... | 134 |
| PacBio sequencing | 135 |
| PacBio demultiplex and cleaning | 135 |
| Integrity analysis | 135 |
| Clonality analysis..... | 136 |
| Modified quantitative Viral Outgrowth Assay (mQVOA) in sorted VLA-4 population | 136 |
| Statistical analyses | 137 |
| Data availability..... | 137 |
| Acknowledgements..... | 137 |
| Author contributions..... | 138 |
| Competing interests..... | 138 |
| Disclaimer | 138 |
| References | 139 |
| Figures..... | 148 |

| | |
|---|-----|
| Tables..... | 154 |
| Supplementary information files | 155 |
| Chapitre 3 – Le séquençage de génomes de VIH quasi complet provenant de plusieurs organes prélevés <i>post mortem</i> chez deux PVVIH sous ART révèle la présence d’expansions clonales disséminées au sein de réservoirs anatomiques distincts | 161 |
| 3.1. Aperçu du projet | 161 |
| 3.1.1. Contexte..... | 161 |
| 3.1.2. Objectifs | 161 |
| 3.1.3. Statut de l’article..... | 162 |
| 3.1.4. Contribution détaillée de chacun des auteurs..... | 162 |
| 3.1.5. Résumé | 162 |
| 3.2. Article #2: Near full-length HIV sequencing in multiple tissues collected post-mortem reveals shared clonal expansions across distinct tissue reservoirs during ART | 164 |
| Abstract..... | 166 |
| Introduction | 167 |
| Results..... | 169 |
| Clinical histories of the two participants..... | 169 |
| HIV DNA persists in multiple tissue reservoirs..... | 170 |
| Residual HIV transcription occurs in several tissues | 170 |
| Genetic integrity of persistent proviruses in anatomical reservoirs during long-term ART | 171 |
| Co-receptor usage and genetic diversity | 172 |
| Tissue reservoirs are highly clonal | 173 |
| Clonally expanded proviruses are evenly distributed across different tissues | 174 |
| Discussion | 176 |

| | |
|--|-----|
| Limitations of the study | 178 |
| Acknowledgements..... | 180 |
| Author contributions..... | 180 |
| Funding | 180 |
| Competing interests..... | 181 |
| Disclaimer | 181 |
| Methods..... | 182 |
| Resource availability | 182 |
| Lead Contact | 182 |
| Materials availability | 182 |
| Data and Code availability | 182 |
| Experimental model and study participant details | 182 |
| Tissue sampling post mortem | 182 |
| Study approval | 183 |
| Method details..... | 183 |
| HIV DNA and RNA quantifications..... | 183 |
| HIV near full-length amplification and sequencing..... | 184 |
| Integrity and statistical analysis | 185 |
| Near full-length HIV genome analysis..... | 185 |
| Compartmentalization analyses..... | 185 |
| Quantification and statistical analyses..... | 186 |
| Reference | 187 |
| Figures..... | 199 |
| Supplementary information files | 203 |

| | |
|--|-----|
| Chapitre 4 – Discussion et perspectives..... | 213 |
| 4.1. La caractérisation génotypique des réservoirs du VIH..... | 216 |
| 4.1.1. L'intégrité des réservoirs du VIH qui persistent..... | 216 |
| 4.1.2. L'hétérogénéité des cellules infectées qui persistent au fil des années de ART..... | 218 |
| 4.1.3. L'importance de la clonalité dans le maintien des réservoirs..... | 219 |
| 4.1.4. La compartimentalisation anatomique des génomes viraux..... | 222 |
| 4.1.5. L'implication des provirus défectifs..... | 223 |
| 4.1.6. Évaluer l'inductibilité des réservoirs..... | 224 |
| 4.2. Limites et perspectives..... | 227 |
| 4.2.1. À la recherche de nouveaux marqueurs du réservoir intact..... | 227 |
| 4.2.2. Phénotyper les réservoirs du VIH dans les tissus profonds..... | 228 |
| 4.2.3. Obtenir simultanément les séquences du provirus quasi complet et du site d'intégration..... | 228 |
| 4.2.4. Déterminer le rôle de VLA-4 dans la persistance..... | 229 |
| 4.2.5. Comprendre l'enrichissement en défaut du Ψ dans les provirus inductibles..... | 231 |
| Épilogue..... | 235 |
| Références bibliographiques..... | 237 |
| Annexes..... | 297 |
| The multifaceted nature of HIV latency..... | 297 |
| Abstract..... | 298 |
| Distinguishing HIV latency and HIV persistence..... | 299 |
| Establishment of HIV latency..... | 302 |
| Locations of HIV reservoirs..... | 305 |
| Molecular mechanisms of HIV latency..... | 306 |

| | |
|--|-----|
| Maintenance of latently infected cells by cell proliferation | 308 |
| Targeting HIV latency <i>in vivo</i> | 308 |
| Conclusions | 311 |
| Acknowledgements..... | 312 |
| Funding | 312 |
| Declaration of interests | 312 |
| References | 313 |
| Figure legends..... | 335 |

Liste des tableaux

| | |
|--|-----|
| Tableau 1. – Les différents marqueurs d’enrichissement du réservoir qui persiste pendant les ART | 88 |
| Tableau 2. – Tableau des méthodes combinant plusieurs mesures du réservoir | 101 |
| Tableau 3. – Résumé des informations recueillies concernant les provirus compétents pour la réplication, les provirus inductibles, et les provirus intacts. | 113 |
| Tableau 4. – Les approches NFL PCR du VIH et leur méthodologie | 215 |

Liste des figures

| | | |
|--------------|---|-----|
| Figure 1. – | Génome du VIH | 39 |
| Figure 2. – | Structure ARN de la portion 5' non-codante du génome viral..... | 40 |
| Figure 3. – | Cycle de réplication du VIH | 42 |
| Figure 4. – | Schéma représentant les différents transcrits du VIH | 43 |
| Figure 5. – | Progression de la charge virale lors des premières semaines d'infection au VIH . | 45 |
| Figure 6. – | Stades Fiebig de la primo-infection au VIH | 46 |
| Figure 7. – | Vers l'épuisement immunologique des T CD8+ cytotoxiques..... | 49 |
| Figure 8. – | Les différentes molécules antirétrovirales..... | 51 |
| Figure 9. – | Stratégies proposées visant à contrôler la réplication virale en absence de ART. | 53 |
| Figure 10. – | Mécanismes d'action des principaux agents de réactivation de la latence | 55 |
| Figure 11. – | Cibles des différents bNAbs sur le trimère de l'Env | 57 |
| Figure 12. – | Les différents profils de progression à l'infection au VIH | 58 |
| Figure 13. – | Ligne du temps du début de la pandémie à aujourd'hui | 62 |
| Figure 14. – | Représentation de l'évolution de la charge virale plasmatique..... | 63 |
| Figure 15. – | Schéma du processus de transcription inverse..... | 66 |
| Figure 16. – | Localisation des réservoirs de cellules infectées par le VIH au niveau cellulaire et tissulaire | 69 |
| Figure 17. – | Mécanismes proposés de la persistance des cellules infectées formant le réservoir | 75 |
| Figure 18. – | Les différentes formes et mesures des réservoirs de cellules infectées qui persistent..... | 76 |
| Figure 19. – | Le HIV-Flow, une méthode de détection par cytométrie en flux des cellules infectées inductibles et compétentes pour la traduction de la capsid virale | 89 |
| Figure 20. – | Schéma représentant les sites de détection du RNA Flow FISH..... | 91 |
| Figure 21. – | Mécanismes proposés expliquant la dynamique d'expansion du réservoir au fil du temps..... | 98 |
| Figure 22. – | Localisation des 18 fragments du génome viral amplifiés par le PheP-seq | 108 |

| | | |
|--------------|---|-----|
| Figure 23. – | L'inductibilité des réservoirs en fonction de l'intégrité provirale | 225 |
| Figure 24. – | Expression de VLA-4 ($\alpha 4\beta 1$) et de son ligand, VCAM-1..... | 230 |
| Figure 25. – | Retrouvailles du laboratoire Chomont dans le cadre de AIDS 2022 | 236 |

Liste des sigles et abréviations

Ψ : « packaging signal »

3TC: Lamivudine

ADCC: « Antigen dependent cellular cytotoxicity »

ADN: Acide désoxyribonucléique

ADNc: ADN complémentaire

ARN: Acide ribonucléique

ARNg : ARN génomique

ARNm: ARN messenger

ART: « Antiretroviral therapy » ou traitements antirétroviraux combinés

ARV: Antirétroviraux

AZT: Azidothymidine

BFA: Brefeldin A

BLT : modèle de souris humanisée « bone marrow – liver – thymus »

bNAbs: Anticorps neutralisant à large spectre, ou « broadly neutralizing antibodies » en anglais

CA: Capside

caRNA: ARN VIH associés aux cellules

CDC: Centers of Disease Control

CMH: Complexe majeur d'histocompatibilité

CMV: Cytomégalovirus

CROI: « Conference of Retroviruses and Opportunistic Infection »

cT_{FH}: T_{FH} circulant

CTL: cellules responsable de la réponse cytotoxique

CTLA-4: « Cytotoxic T-lymphocyte antigen 4 »

d4T: Stavudine

dCA: Didehydro-cortistatin A

ddC: Zalcitabine

ddl: Didanosine

ddPCR: « Digital droplet polymerase chain reaction »

EAE: encéphalomyélite auto-immune expérimentale

EBV: Virus Epstein Barr

FDA: Food and Drug Administration

HAND: « HIV-associated neurocognitive disorders »

HDAC: Histone déacétylase

HPV : virus du papillome humain

HSCT: Greffe de cellules souches hématopoïétiques, ou « hematopoietic stem-cell transplant » en anglais

IAS: « International AIDS Society »

ICTV: International Committee on Taxonomy of Virus

IDV: Indinavir

IL-2 : Interleukine 2

IL-7: Interleukine 7

IN: Intégrase

IFN- γ : interféron gamma

INI: Inhibiteur de l'intégrase

INNTI: Inhibiteur non-nucléosidique de la transcriptase inverse

INTI: Inhibiteur nucléosidique de la transcriptase inverse

iono: Ionomycine

IP: Inhibiteur de protéase

IPDA: « Intact proviral DNA assay »

IUPMs: « Infectious unit per million CD4+ T cells »

JC: virus John Cunningham

kb: Kilopaire de bases

LAG-3: « Lymphocyte activation gene 3 »

LCM: Microdissection par capture laser

LRA: Agents de réversion de la latence, ou « latency reversing agent » en anglais

LTR: « Long terminal repeat »

MA: Matrice

MAIT: T invariants associés aux muqueuses

MSD: « Major splice donor site »

msRNA: ARN viraux complètement épissés

NC: Nucléocapside

nef: « Negative factor »

NFL: quasi complet, ou « near full-length » en anglais

ng: nanogramme

NK: « Natural killer »

nm: nanomètre

ORF: Cadre de lecture ouvert, ou « open reading frame » en anglais

P-TEFb: « Positive Transcription Elongation Factor »

pb: Paire de bases

PBMCs: Cellules mononuclées du sang périphérique, ou « peripheral blood mononuclear cells » en anglais

PBS: « Primer binding site »

PCR: « Polymerase chain reaction »

PD-1: « Programmed death-1 »

pDC: Cellules dendritiques plasmacytoïdes

PEP: Prophylaxie post-exposition

PHA: Phytohémagglutinine

PI: Post-infection

PMA: Phorbol 12-myristate 13-acetate

PML : leucoencéphalopathie multifocale progressive

PR: Protéase

PrEP: Prophylaxie pré-exposition

PVVIH: Personne vivant avec le VIH

qPCR: « Quantitative polymerase chain reaction »

qVOA: « Quantitative viral outgrowth assay »
rev: « RNA splicing regulator »
RIG-I: « Retinoid-induced gene 1 »
RRE: « Rev responsive element »
RT: Transcriptase inverse
RTV: Ritonavir
scRNA-seq: Séquençage des ARNm au niveau de la cellule individuelle
SIDA: Syndrome d'immunodéficience acquise
SIV : Virus d'immunodéficience simienne
SQV: Saquinavir
tat: « Transactivator protein »
T_{CM}: T central mémoire
TCR: Récepteur T
T_{EM}: T effecteur mémoire
T_{FH}: « T follicular helper »
T_{FM}: T mémoire folliculaire
TI: Interruption des traitements, ou « treatment interruption »
TIGIT: « T-cell immunoglobulin and ITIM domain »
TILDA: « Tat/rev induced limiting dilution assay »
T_M: T mémoire
TNF : « tumor necrosis factor »
T_{Reg}: T régulateur
T_{RM}: T mémoire résidentes des tissus
T_{TM}: T transitionnel mémoire
usRNA: ARN viraux non-épissés
vif: « Viral infectivity protein »
VIH: Virus d'immunodéficience humaine
VISCONTI: « Viro-Immunological Sustained CONTROL after Treatment Interruption »
vpr: « Viral protein R »

vpu: « Viral protein unique »

WGA: Amplification complète du génome, ou « whole genome amplification » en anglais

µg: microgramme

µl: microlitre

usRNA : ARN viral non-épissé

À Lily, à Margot

*Parce que la science d'aujourd'hui
est faite pour les prochaines générations comme la vôtre*

Remerciements

Ah, les remerciements, cette page si chargée en émotions! D'abord et avant tout, bien évidemment, merci à mon directeur, Nicolas Chomont. Je ne savais pas dans quoi je m'embarquais, ni même à quel point c'est un honneur de faire partie de ton laboratoire. Merci d'être un directeur humain et présent, qui veut le mieux pour ses étudiants tout en respectant leur limite. Merci aussi d'avoir fait de ton laboratoire un endroit où tout est possible, où on ne manque de rien, et où on peut s'exprimer. Tu es la preuve qu'on peut faire de la bonne science dans la bonne humeur, sans compétition et en ayant à cœur de vulgariser nos recherches aux gens concernés.

Merci à Rémi, le bras droit, mais surtout le diplomate du labo. Je ne sais sincèrement pas comment j'aurais survécu à tout ça sans toi. Merci d'avoir géré mes émotions et mes paniques, j'espère garder un peu de ton sens de la diplomatie par la suite.

Merci à Amélie, la reine des PCR, l'assistante de recherche de tous les talents. Merci d'avoir écouté tous mes plans de match et débriefing de manips, même quand tu étais occupée, et pour tous les coups de main que tu as faits pour moi.

Merci à mes collègues actuels et passés : Louise, Gabriel, Johann, Hawley, Marion, Tommy, Marta, Julia, Pierre, Antoine, Isabelle, Alessandro, Armando, César, Hélène, Camille et Quentin. J'en ai vu du beau monde passer dans ce laboratoire, et chaque fois, on finissait toujours par former un joli petit groupe hétéroclite, mais tissé serré.

Merci à Corentin, qui m'a sauvé pour l'analyse des séquences brutes. Tu as été l'éclairagiste à mon spectacle : sans toi, on n'aurait rien vu de tout ça!

Merci à Dominique, Philippe et Gaël de la plateforme de cytométrie, parce que je vous en ai fait passer des heures à regarder une cellule se faire trier aux 15 minutes!

Merci aux comparses étudiants du 9^e étage qui rendent le quotidien beaucoup plus agréable, et particulièrement à Gérémy pour les projets communs et le support moral, et à Vincent pour toutes nos discussions non scientifiques.

Merci aux organismes subventionnaires IRSC et FRQS, ainsi qu'aux différents prix et bourses que j'ai obtenus durant ma thèse. La vie d'étudiante au doctorat, c'est un peu une vie de misère sans support financier, et chaque prix est une reconnaissance tellement appréciée.

Merci à mes amis et amies (Catherine, Alicia, Marie-Eve, Émilie, Élyse, Émilie, Brooks) d'avoir toujours été fière de moi, et de me l'avoir répété souvent. Merci à Benoit et Pierre-André pour votre soutien et votre accueil, c'est tombé à point!

Merci à mon ami Laurent, qui a non seulement enduré tous mes sauts d'humeur pendant 4 ans, mais qui a écouté avec enthousiasme toutes les fois où je lui ai raconté mes misères de labo, même s'il n'y comprenait rien. Merci aussi pour l'initiation aux bases de données, ça m'a évité 3 semaines de Google et de YouTube, et j'ai eu l'air bien intelligente au labo avec ça.

Merci à Jay, qui est embarqué dans ma vie et mon univers de recherche comme on embarque dans un train sans savoir où il va. Nos deux mondes se sont rencontrés par un curieux hasard, mais tu as vécu à côté de moi c'était quoi, faire un doctorat, sans jamais t'en plaindre, et avec tout le support dont j'avais besoin. Merci pour ça.

Et finalement, je voudrais dire à ma famille (Gervais, Céline, Benoit, Simon, Stéphanie, Anick, Lily, Margot, Kat, Michel, Jes et Zoé) ce qu'on dit toujours à la fin des présentations, alors que c'est surtout à eux que ça devrait s'adresser : merci pour votre écoute! À 30 ans, alors que mes frères s'évertuaient plutôt à faire ce que des adultes normaux font, c'est-à-dire former une famille, moi je me suis embarquée dans une aventure un peu dure à suivre pendant 5 ans sans que vous ne disiez jamais « un mot su'à game ». Vous m'avez écouté décrire mon quotidien un peu abstrait, et vous avez continué à me demander « pis comment ça va au labo? » même quand la réponse était un peu trop longue et complexe. Et quand je n'avais aucune réponse viable à votre question « mais tu fais quoi avec ça après? », vous n'avez jamais fait de commentaire. Merci pour tout ça, pour m'avoir nourri dans mes moments de rush, pour avoir fait l'aller-retour Montréal-Baie-Comeau juste parce que j'avais besoin de prendre l'air, pis pour avoir trouvé que c'était donc extraordinaire ce que je faisais quand moi je ne le voyais plus. Et merci à mes fidèles poilus.

Avant-propos

Je suis tombée dans la recherche par inadvertance, encore plus en ce qui concerne le VIH. Durant mon baccalauréat, le dernier cours optionnel que je voulais suivre ne se donnait pas à la saison où j'étais rendue, alors j'ai suivi un peu par dépit le cours de virologie. J'y ai rencontré Lionel Berthoux, qui cherchait à ce moment un ou une étudiant(e) pour faire un stage d'été dans son laboratoire sur les facteurs de transcription du VIH. J'ai postulé. J'ai eu la bourse CRSNG parce que quelqu'un s'est désisté. J'ai assez accroché pour avoir le goût d'y faire ma maîtrise.

Une fois les pieds à Montréal, en pleine rédaction, j'ai contacté Nicolas Chomont. Je l'avais rencontré lors d'une conférence FRQS-SIDA à l'automne, et je m'étais dit que tant qu'à faire un doctorat, ce serait chez lui. Je n'avais pas plus réfléchi à mon avenir en recherche que ça. Il m'a pris dans son équipe, et le 8 janvier 2018, je m'étais les pieds au CRCHUM pour 5 ans et 2 mois.

Le VIH est, et restera, un virus qui me fascine. C'est le jeu d'évasion le plus compliqué que j'ai rencontré, et Dieu sait que les jeux d'évasion, chez les Chomont, on aime ça. J'arrivais avec ma formation en biologie cellulaire et moléculaire dans une équipe d'immunologistes, et c'était tout un clash. Le nombre de fois où j'ai eu des absences lors de discussions d'immunologie est presque honteux. Cela dit, la beauté de la recherche, c'est qu'elle permet de maximiser les forces de tout le monde, et donc quoi de mieux que d'attaquer un projet qui vise à séquencer les génomes de VIH qui persistent durant les traitements antirétroviraux. Ce projet, je l'ai parti de zéro, allant de l'achat des équipements de bases en biologie moléculaire à l'apprentissage de la gestion de base de données. Ça aura pris un an avant de faire fonctionner la technique de PCR, et presque un an de plus avant d'obtenir ma première séquence... juste à temps pour une pandémie mondiale.

Le VIH persiste durant des années, et comme lui, j'ai bravé contre vents et marées les embûches, les dates limites, les multiples présentations, le prédoc, le stress et mon éternel syndrome d'imposteur. Je n'ai pas trouvé de remède contre le VIH, mais je sais que le travail que j'ai accompli permettra de mieux comprendre les réservoirs du VIH dans l'avenir, et que cette méthode de séquençage de provirus quasi complet au niveau de la cellule unique continuera à servir.

Chapitre 1 – Introduction

1.1. Le VIH/SIDA

1.1.1. Découverte

2023 marque les 40 ans de l'isolation et de l'identification du virus de l'immunodéficience humaine (VIH) (Barre-Sinoussi et al., 1983; Gallo et al., 1984), agent causal du syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA). La découverte de ce pathogène survenait deux ans après la publication du premier rapport du Centers of Disease Control (CDC) ((CDC), 1981b) détaillant le cas de cinq jeunes hommes, âgés de 29 à 36 ans, sans antécédents médicaux et souffrant de pneumonie à *Pneumocystis carinii*, de candidose et de complications à l'infection au cytomégalovirus (CMV) (Gottlieb et al., 1981). Ces trois manifestations sont dites opportunistes, c'est-à-dire qu'elles ne causent généralement des symptômes qu'à des individus dont l'immunité est compromise. Ceci peut être causé par la prise de certains médicaments immunosuppresseurs (entre autres lors de traitements de cancer ou transplant d'organe), une condition médicale précise (telle une leucémie aigüe et un lymphome non-Hodgkinien) (National Center for Immunization and Respiratory Diseases (NCIRD), 2023), ou encore lorsqu'une personne se retrouve avec un compte de lymphocytes T CD4+ par mm³ (1 mm³ = 1 µl [microlitre]) de sang en dessous de 200 (Organization, 2022b)). D'autres rapports de cas ont rapidement suivi ((CDC), 1981a; Friedman-Kien, 1981), révélant une fréquence anormalement élevée de sarcome de Kaposi chez cette même population de jeunes hommes homosexuels, et un inquiétant taux de mortalité dans les deux années suivant le diagnostic. En somme, ces hommes présentaient tous une importante lymphopénie sans cause identifiable (Friedman-Kien, 1981; Gottlieb et al., 1981).

1.1.2. Début des antirétroviraux

Il faudra attendre 1985 avant qu'apparaisse l'ébauche de traitement pour ralentir la progression du SIDA, le stade terminal de l'infection au VIH. Il s'agit de l'azidothymidine (AZT), un inhibiteur nucléosidique de la transcriptase inverse (INTI) qui interfère dans le cycle viral, à l'étape de la transcription inverse du génome viral d'ARN (acide ribonucléique) en ADN (acide désoxyribonucléique) (Mitsuya et al., 1985). En 1987, soit 6 ans après le rapport du CDC, les

résultats du premier essai clinique, qui incluait 282 personnes ayant développé le SIDA et mis sous AZT pendant 24 semaines, sont publiés. Cette étude en double-aveugle rapporte deux fois moins de cas d'infections opportunistes, une amélioration du compte CD4+ et une nette diminution de la mortalité (1 VS 19) parmi le groupe traité à l'AZT comparativement au groupe contrôle (Fischl et al., 1987). Cette étude mena à son approbation par la FDA (Food and Drug Administration). Il s'ensuivit l'approbation de trois autres INTI, aux effets secondaires prononcés et dont l'utilisation n'est plus recommandée aujourd'hui : la didanosine (ddI) en 1991, la zalcitabine (ddC) en 1992 et la stavudine (d4T) en 1994 (Li et al., 2022). Malheureusement, l'amélioration des symptômes cliniques chez les personnes au stade SIDA n'était que de courte durée, et il fut démontré, dès 1989, que l'utilisation d'un INTI en monothérapie entraînait la sélection de virus résistants (Larder & Kemp, 1989). La combinaison de l'AZT avec la lamivudine (3TC), un 5^e INTI moins toxique, développé à Montréal en 1991 (Soudeyins et al., 1991) et approuvé en 1995 (Li et al., 2022), fut la première preuve de concept du potentiel synergique des médicaments antirétroviraux (ARVs) (Bartlett et al., 1996; Eron et al., 1995; Katlama et al., 1996; Kuritzkes et al., 1996). Au même moment arrivait dans l'arsenal pharmacologique une deuxième classe d'ARV, les inhibiteurs de protéase (IP), avec le saquinavir (SQV) en 1995, ainsi que l'indinavir (IDV) et le ritonavir (RTV) en 1996. Cette nouvelle classe d'ARV pava la voie aux fondements de la trithérapie, une réelle révolution dans le traitement des personnes vivant avec le VIH (PVVIH), présentée en primeur lors de la 11^e conférence internationale AIDS tenue à Vancouver en 1996 (Gulick et al., 1996). Cette équipe démontra que la prise d'un cocktail d'ARVs, composé d'IDV, d'AZT et de 3TC, permet une diminution de la charge virale sous les 500 copies par ml chez la majorité des PVVIH ainsi qu'une amélioration de leur compte CD4, et ce, sur une période soutenue de 52 semaines (Gulick et al., 1997). Par la suite, l'étude *HIV Outpatient* évalua la progression clinique, entre janvier 1994 et juin 1997, de 1255 PVVIH mises sous ARV et ayant eu au moins un compte CD4+ inférieur à 100 cellules par µl. Cette analyse démontra qu'une trithérapie incorporant un IP réduisait considérablement l'incidence du SIDA chez ces personnes, passant de 50 % en 1994 à 13,3 % en 1997 (Palella et al., 1998). L'infection au VIH commença alors à être considérée comme une maladie chronique plutôt qu'une infection mortelle. Il fut estimé que la trithérapie mènerait éventuellement à l'éradication de l'infection après 3 ans de

traitement (Perelson et al., 1997). Force est de constater qu'un quart de siècle plus tard, et malgré le travail acharné de scientifiques à travers le monde, aucun vaccin ni traitement curatif à grande échelle n'existent contre l'infection au VIH.

1.1.3. Taxonomie et définition

Pour comprendre pourquoi le VIH est une infection dont on ne guérit pas, il faut d'abord s'intéresser au virus. Par définition, un virus est un parasite intracellulaire, de 6 à 300 nm (nanomètre) de diamètre, possédant un seul type d'acide nucléique (ADN ou ARN), et qui doit obligatoirement infecter une cellule cible pour se reproduire (Modrow et al., 2013). Depuis 2020, l'International Committee on Taxonomy of Virus (ICTV) classifie le VIH comme un virus du royaume des *Riboviria* (virus utilisant une polymérase virale dépendante à l'ARN pour sa réplication), du règne des *Pararnavirae* (virus ayant une polymérase virale de type transcriptase inverse [RT]), de l'ordre des *Ortervirales* (virus à ARN simple-brin qui se réplique via un intermédiaire ADN, ou à ADN double-brin qui se réplique via un intermédiaire ARN), de la famille des *Retroviridae* (virus enveloppés qui rétro-transcrivent leur ARN en ADN et l'intègrent), de la sous-famille des *Orthoretrovirinae* (virus ayant deux copies d'ARN simple-brin comme matériel génétique) et du genre des *Lentivirus* (virus à longue période d'incubation causant des maladies chroniques et mortelles chez les mammifères) (Viruses, 2022). En somme, le VIH convertit son ARN viral en ADN afin de l'incorporer de façon permanente dans le génome cellulaire. Suite à l'infection d'un individu par le VIH, la pathologie progresse lentement, menant dans la vaste majorité des cas à la mort de l'individu.

1.1.4. Tropisme

Chaque espèce de virus possède un tropisme qui lui est propre en fonction des récepteurs, et parfois corécepteurs, cellulaires qu'il utilise pour entrer dans le cytoplasme de la cellule cible (Vabret & Miszczak, 2010). Le récepteur du VIH, identifié en 1984 (Dalglish et al., 1984; Klatzmann et al., 1984), est la glycoprotéine membranaire CD4, majoritairement exprimée à la surface des lymphocytes T « helper », dit T CD4+, mais également présente sur les macrophages, les cellules dendritiques et les microglies (Fanales-Belasio et al., 2010). Le CD4 est directement impliqué dans l'activation de ces cellules immunitaires, puisqu'il se lie à une portion conservée

du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe II lors de la présentation d'un peptide antigénique par les cellules présentatrices d'antigènes (Owen et al., 2013; Chapitre 3 - Receptors and Signalling: B and T-Cell Receptors). En plus du CD4, l'infection au VIH nécessite la liaison à un corécepteur. Il peut s'agir du récepteur de chimiokine CCR5 (Alkhatib et al., 1996; Deng et al., 1996; Dragic et al., 1996) pour les virus dits R5- ou M-tropique (car CCR5, d'abord connu sous le nom CC-CKR-5, est fortement exprimé à la surface des macrophages), ou du récepteur de chimiokine CXCR4 (Feng et al., 1996) pour les virus dits X4- ou TCL-tropique (car CXCR4, initialement nommé « fusin », est retrouvé en grande quantité sur les cellules T) (Broder & Berger, 1995). Certaines souches de VIH peuvent être polyvalentes et utiliser l'un ou l'autre des corécepteurs : on parle alors de VIH dual- ou X4R5-tropique (Doranz et al., 1996). Les lymphocytes T CD4+ activés, suite à la reconnaissance d'un antigène spécifique via leur récepteur T (TCR), ont la particularité d'exprimer de hauts niveaux tant de CCR5 que de CXCR4, ce qui en fait une cellule cible de choix pour l'infection au VIH (Alkhatib & Berger, 2007). Fait intéressant, une variété de corécepteurs alternatifs a été identifiée *in vitro*, incluant les corécepteurs couplés à une protéine G que sont entre autres CCR1, CCR3, CCR8, CXCR4, FPRL1, GPR1, CCR9B, CCR10, et XCR1 (Shimizu et al., 2009), mais aucune implication *in vivo* ne leur a été démontrée.

1.1.5. Génome viral

1.1.5.1. Gènes de protéines de structure et d'enzymes

Sur le plan moléculaire, le génome d'environ 9800 paires de bases (pb) du VIH de type 1 (VIH-1, qui sera dénommé simplement VIH pour la suite de cette thèse) est constitué de 9 ORFs (cadre de lecture ouvert, ou « open reading frame » en anglais) (Figure 1.). Parmi ces ORFs, on retrouve trois gènes codant pour des protéines de structure et des enzymes, codant tous les trois pour des poly-protéines ("Human Immunodeficiency Viruses and Human T-Cell Lymphotropic Viruses," 1996) :

- *gag* (« group-specific antigen ») : ORF codant pour la polyprotéine du cœur viral Gag, composé de la matrice (MA), de la capsid (CA, souvent référée comme la p24) et de la nucléocapsid (NC) et de p6 (protéine impliqué dans le bourgeonnement des particules virales);

- *pol* (« polymerase ») : ORF codant pour la polyprotéine des enzymes virales que sont la protéase (PR), la transcriptase inverse (RT) et l'intégrase (IN);
- *env* (« envelope »): codant pour les protéines d'enveloppe virale, constituée de la glycoprotéine de surface gp120 et de la glycoprotéine membranaire gp41.

1.1.5.2. Gènes de protéines régulatrices et accessoires

Le génome viral contient aussi deux gènes codant pour des protéines régulatrices (*tat* et *rev*) et quatre gènes pour des protéines dites accessoires (*vif*, *vpr*, *vpu*, *nef*) ("Human Immunodeficiency Viruses and Human T-Cell Lymphotropic Viruses," 1996) (Figure 1.) :

- Tat (« transactivator protein ») active la transcription et l'élongation des ARNm (ARNm) en se liant à la région non-codante TAR, située dans le 5'LTR des ARN transcrits (Sodroski et al., 1986);
- Rev (« RNA splicing regulator ») est responsable de l'export des ARNm viraux partiellement épissés ou non épissés (Malim et al., 1989), via la liaison à la région RRE (Rev Responsive Element);
- Vif (« viral infectivity factor ») contrecarre le facteur de restriction APOBEC3G afin de limiter les hypermutations G→A durant la transcription inverse (Sheehy et al., 2002);
- Vpr (« virus protein R ») arrête le cycle cellulaire en phase G2 (He et al., 1995; Jowett et al., 1995; Re et al., 1995);
- Vpu (« viral protein U ») favorise le relargage des particules virales nouvellement produites en contrecarrant l'action du facteur de restriction Tetherin/BST-2 (Neil et al., 2008), en plus de dégrader le CD4 exprimé à la surface cellulaire (Willey et al., 1992);
- Nef (« negative factor ») améliore l'infectivité des particules virales et entraîne une diminution d'expression de CD4 (Garcia & Miller, 1991) et des molécules HLA sur les cellules infectées (Schwartz et al., 1996).

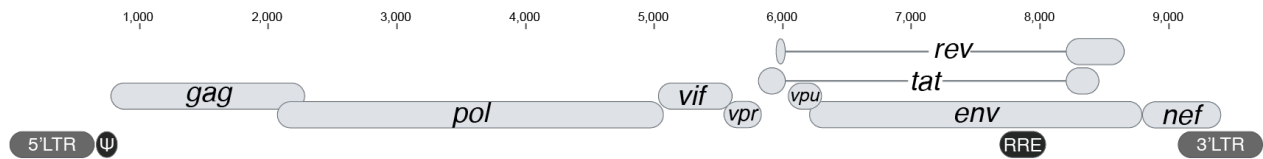


Figure 1. – Génome du VIH

Le VIH est composé de 9 ORF, codant pour 15 protéines, dont la traduction nécessite un changement de cadre de lecture et de l'épissage alternatif. On retrouve également des régions régulatrices non-codantes : les LTRs aux extrémités, le ψ et le RRE.

1.1.5.3. LTRs

Chaque extrémité de l'ADN viral est flanquée d'un LTR (« long terminal repeat ») de 634 pb (référence HXB2, GenBank K03455) et composé de 3 régions non-codantes : U3 (positions 1 à 455), R (positions 456 à 551) et U5 (positions 552 à 634). Ces 2 LTRs sont orientés dans le même sens 5'-3', et sont identiques, bien qu'une certaine asymétrie structurelle, souvent due à une délétion en 3', soit possible (Joseph et al., 2022). Le 5'LTR sert de promoteur à la transcription de l'ADN viral intégré dans la cellule infectée, puisqu'il contient des sites de liaisons pour les facteurs de transcription cellulaires comme NF- κ B (Kawakami et al., 1988; Nabel & Baltimore, 1987), Sp1 (Leonard et al., 1989; Ross et al., 1991) et NF-AT (Li et al., 1991). Il contient aussi la région TAR (positions 453 à 513), site de liaison de la protéine Tat présent sur les transcrits viraux, permettant de stimuler la transcription et l'élongation (Song et al., 2008). C'est en amont de TAR que se trouve le site d'initiation de la transcription (position 455, correspondant au premier nucléotide dans la Figure 2.). Le 5'LTR est immédiatement suivi par une portion non-codante formant des structures dans l'ARN viral, essentielles à la réplication : le PBS (positions 636 à 649) et le Ψ (« packaging signal » ou signal d'encapsidation) (positions 686 à 823) (Baudin et al., 1993) (Figure 2.). Le PBS (« primer binding site »), tout de suite en aval de 5'LTR, forme une structure d'épingle à cheveux avec U5, servant à l'initiation de la transcription inverse (Beerens et al., 2000). Vient ensuite le locus Ψ , qui possède le site donneur principal 1 (« Major Donor Site 1 » ou MSD pour « major splice donor site ») pour l'épissage, ainsi que la région d'encapsidation (« packaging signal ») composée de 4 structures tige-boucles (« stem loops » : SL1, SL2, SL3, SL4) impliquées dans la dimérisation et l'encapsidation des ARN génomiques viraux (ARNg) (Clever et al., 1995; Clever & Parslow, 1997; McBride & Panganiban, 1996). Finalement, un dernier site de régulation,

l'IRES, situé dans le gène *gag*, permet l'entrée des ARNm dans les ribosomes de manière coiffe-indépendante (Buck et al., 2001).

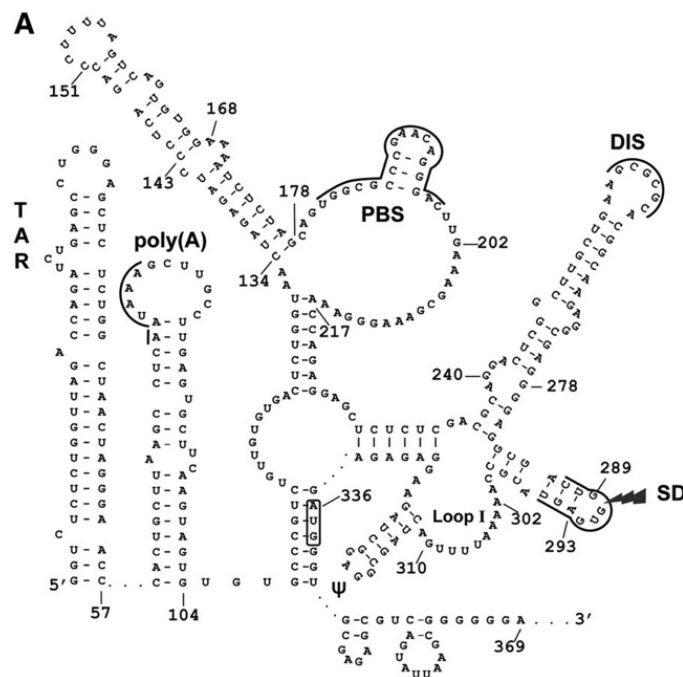


Figure 2. – Structure ARN de la portion 5' non-codante du génome viral

Le 5'LTR et la région du ψ sont des portions non-codantes du génome qui servent de promoteur à la transcription virale. Cette portion génomique engendre un ARN fortement structuré, débutant ici à la position +1 de la transcription (position 455 sur le génome de référence HXB2). On peut y voir les structures du TAR, du polyA, du PBS, ainsi que le site de dimérisation (DIS), la première tige-boucle (Loop 1) et le MSD (SD) du ψ . Le codon d'initiation de la traduction (AUG) est indiqué parmi ces structures (figure 1a tirée de Gendron et al., 2011).

Le 3'LTR, quant à lui, possède le site de polyadénylation (positions 9612 à 9617) nécessaire à la protection et à l'export nucléaire des ARNm transcrits (Das et al., 1997; Zhang & Crumpacker, 2022).

1.1.6. Cycle viral : De l'infection à la production de virions

Le virus entre en contact avec sa cellule cible via la reconnaissance du CD4 par la gp120 (Figure 3.). Cette liaison (1) entraîne un changement de conformation dans la gp120, lui permettant de se lier au corécepteur CCR5 ou CXCR4. Suivra la fusion (2) de l'enveloppe virale à

la membrane cellulaire, ayant pour effet de relarguer le cœur viral dans le cytoplasme. C'est à ce moment que débute la transcription inverse, ou rétro-transcription (3) de l'ARN viral simple brin en ADN viral double-brin. Celui-ci formera le complexe de pré-intégration avec l'IN, qui sera alors transporté dans le noyau via les pores nucléaires (4). La décapsidation du cœur viral (5) se produit quant à elle, dans le noyau de la cellule, près du site d'intégration, afin de préserver le processus de transcription inverse (Burdick et al., 2020; Zila et al., 2021). Quelques minutes après la libération de l'ADN viral dans le noyau (Li et al., 2021), l'IN l'intégrera aléatoirement de façon permanente au sein du génome cellulaire (6) (toutes les étapes du cycle viral sont résumées dans German Advisory Committee Blood, 2016). Une cellule productivement infectée et activée peut à ce moment amorcer la transcription (7) à l'aide de la machinerie cellulaire. Elle devra synthétiser les différentes protéines et enzymes virales (8) nécessaires à la formation du cœur viral, ainsi que des copies de son matériel génétique sous la forme d'ARN simple-brin. L'assemblage se produit dans le cytoplasme, tout près de la membrane cellulaire : deux ARNs simple-brin sont dimérisés et encapsidés (9) dans le cœur viral, grâce aux protéines Gag (Ono, 2010), et le bourgeonnement du cœur viral (10) hors de la cellule permet de former l'enveloppe virale, à la surface de laquelle sont retrouvées les protéines virales gp120 et gp41. Finalement, une fois relargué, le virion subira une dernière étape dite de maturation (11) induite par la protéase virale, afin qu'il devienne pleinement compétent à infecter une nouvelle cellule cible. Il est estimé qu'un cycle d'infection complet, entre le moment où le virion est relargué et la production de nouvelles particules virales par la cellule qu'il aura infectée, dure environ 2,6 jours (Perelson et al., 1996), qu'une cellule productivement infectée relâche 10^3 virions par jour, et que 10 % d'entre eux sont infectieux (Dimitrov et al., 1993). Les virus nouvellement produits ont quant à eux une courte demi-vie plasmatique d'approximativement 7 heures (Perelson et al., 1996).

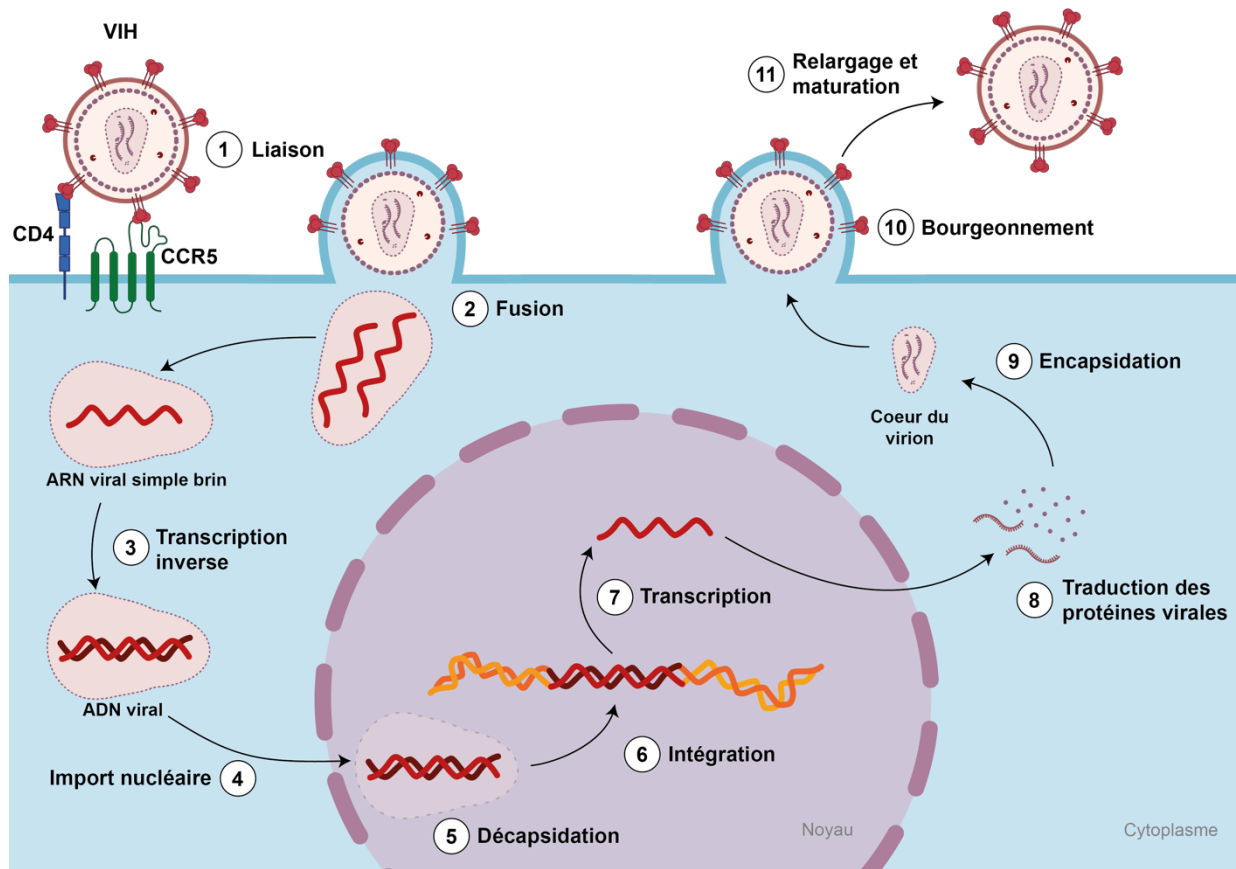


Figure 3. – Cycle de réplication du VIH

Les 11 grandes étapes du cycle viral : de l'entrée du virus au relargage des virions matures, sont schématisées (adaptée de Deeks et al., 2015).

1.1.7. Transcription du VIH

Le matériel génétique du VIH sert autant à produire des ARNm pour la synthèse des protéines virales qu'à copier son propre génome. La transcription du VIH requiert des facteurs de transcription cellulaire, dont NF- κ B (Duh et al., 1989; Nabel & Baltimore, 1987) pour l'initiation, et P-TEFb (« Positive Transcription Elongation Factor ») pour l'élongation (Herrmann & Rice, 1995; Zhou et al., 1998; Zhu et al., 1997). L'ARNm viral est ensuite traité comme un ARNm cellulaire : il contient une coiffe en 5' et une queue poly-A en 3', et sera traduit par les ribosomes après épissage. Une des particularités de l'épissage des ARNm viraux est que celui-ci ne sert pas à éliminer les introns, mais plutôt à produire des ARNm codants pour les différentes protéines, étant donné que la plupart des gènes du VIH se chevauchent (Kuzembayeva et al., 2014). Quatre

sites donneurs d'épissage (5'ss; identifiés D1 à D4) et 7 sites accepteurs (3'ss; identifiés A1 à A7) sont retrouvés dans le génome du VIH (Karn & Stoltzfus, 2012) (Figure 4.). Durant la phase de réplication, les ARNm multi-épissés, d'environ 1800 pb, sont les premiers à être produits, afin de traduire pour les protéines Tat, Rev et Nef (Purcell & Martin, 1993). Viendront ensuite les ARNm partiellement épissés, d'environ 4000 pb, pour permettre la synthèse de Vif, Env, Vpu et Vpr (Cullen, 1998). Finalement, l'ARNm non-épissé de ~9000 pb servira autant de gabarit pour la synthèse de Gag et Gag-Pol que d'ARNg, qui sera quant à lui encapsidé dans les nouvelles particules virales en formation (Emery et al., 2017). La transcription des ARNm partiellement épissés et non-épissés requiert la présence de Tat (pour l'élongation de la transcription) et de Rev (pour l'export des ARNm dont l'épissage n'est pas complet via l'association avec le RRE (« Rev Responsive Element ») situé dans la région de *env*), ce qui explique pourquoi ils sont produits plus tard durant le cycle de réplication.

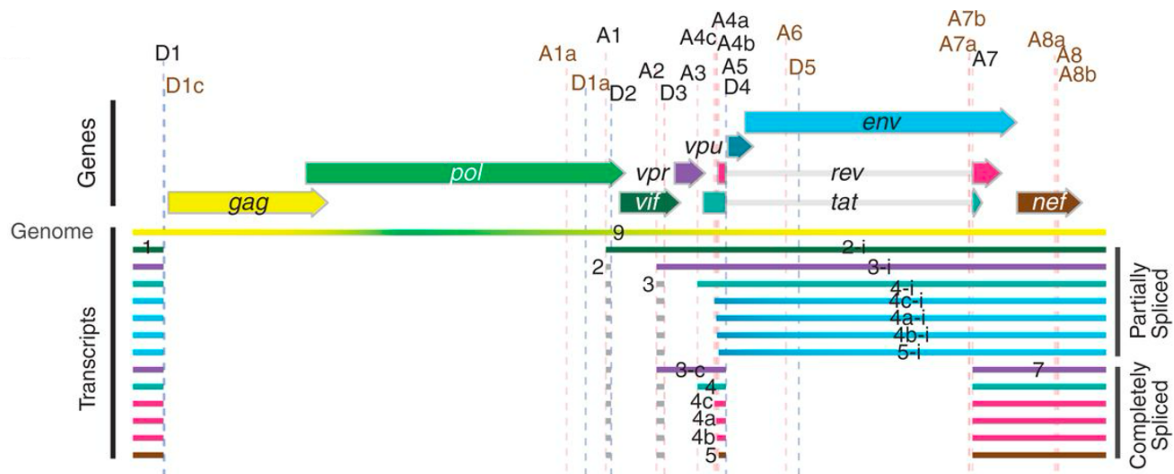


Figure 4. – Schéma représentant les différents transcrits du VIH

Grâce aux multiples sites donneurs (D1 à D5) et accepteurs d'épissage (A1 à A8), le génome du VIH peut être transcrit en ARN non-épissé (~9 kb; permettant la synthèse des glycoprotéines **Gag** et **Pol**), en ARN partiellement épissé (« partially spliced » de ~4 kb; transcrits permettant la synthèse de **Vif**, **Vpr**, **Tat**, **Env** et **Vpu**), ou en ARN pleinement épissé (« completely spliced » de ~1,8 kb; transcrits permettant la synthèse de **Vpr**, **Tat**, **Rev** et **Nef**). Ces différentes formes d'ARN viraux permettent ainsi de traduire les 15 protéines virales (figure 1a tirée de Ocwieja et al., 2012).

1.2. Pathogénèse

1.2.1. Mode de transmission

Le VIH est présent dans plusieurs liquides corporels, dont le sang, le sperme, les sécrétions vaginales et le lait maternel (Organization, 2022a). Le mode de transmission le plus fréquent à l'échelle mondiale demeure lors de relation sexuelle non protégée, qu'elle soit hétérosexuelle ou homosexuelle, avec une PVVIH dont la charge virale n'est pas indétectable (Shaw & Hunter, 2012). Cependant, le VIH peut aussi se transmettre par contact direct avec le sang, principalement via du matériel souillé en milieu médical, ou encore lors de partages de seringues chez les utilisateurs de drogues injectables. En absence de prise de ART (traitement d'antirétroviraux combinés), une transmission verticale (de la mère à l'enfant) peut survenir, soit lors de l'accouchement, soit lors de l'allaitement.

1.2.2. Phase aigüe, ou la primo-infection

La transmission d'une seule particule virale peut être à l'origine d'une infection (Keele et al., 2008). Ces virus, dits fondateurs, présentent généralement un tropisme R5 et infectent quasi-exclusivement les lymphocytes T CD4+ (Salazar-Gonzalez et al., 2009). Durant les premiers jours de l'infection, le VIH se réplique localement au niveau de la muqueuse, mais est rapidement retrouvé au niveau des ganglions lymphatiques drainants (revu dans Kahn & Walker, 1998). Cette première étape dite phase d'éclipse se caractérise par l'absence de symptômes et d'ARN viraux mesurables dans le sang (revu dans McMichael et al., 2010) (Figure 5.). Les ganglions lymphatiques naturellement riches en cellules T CD4+ activées constituent un foyer important de réplication virale (Pantaleo et al., 1993) et seraient la source de propagation du virus vers d'autres tissus lymphoïdes. Cette phase dite de dissémination, d'une durée d'environ deux semaines, est la période au cours de laquelle la charge virale plasmatique atteint son sommet et que des symptômes grippaux non-spécifiques (fièvre, fatigue, maux de tête, maux de gorge, myalgie, etc.) sont souvent rapportés (Tindall et al., 1988). C'est aussi durant cette période que le risque de transmission est le plus élevé (Gurunathan et al., 2009). D'après des modèles primates non humains d'infection au SIV (virus d'immunodéficience simienne), le réservoir de cellules infectées

ayant la capacité de persister sous ART s'établit dans les premières 72h post-infection (PI) (Whitney et al., 2014).

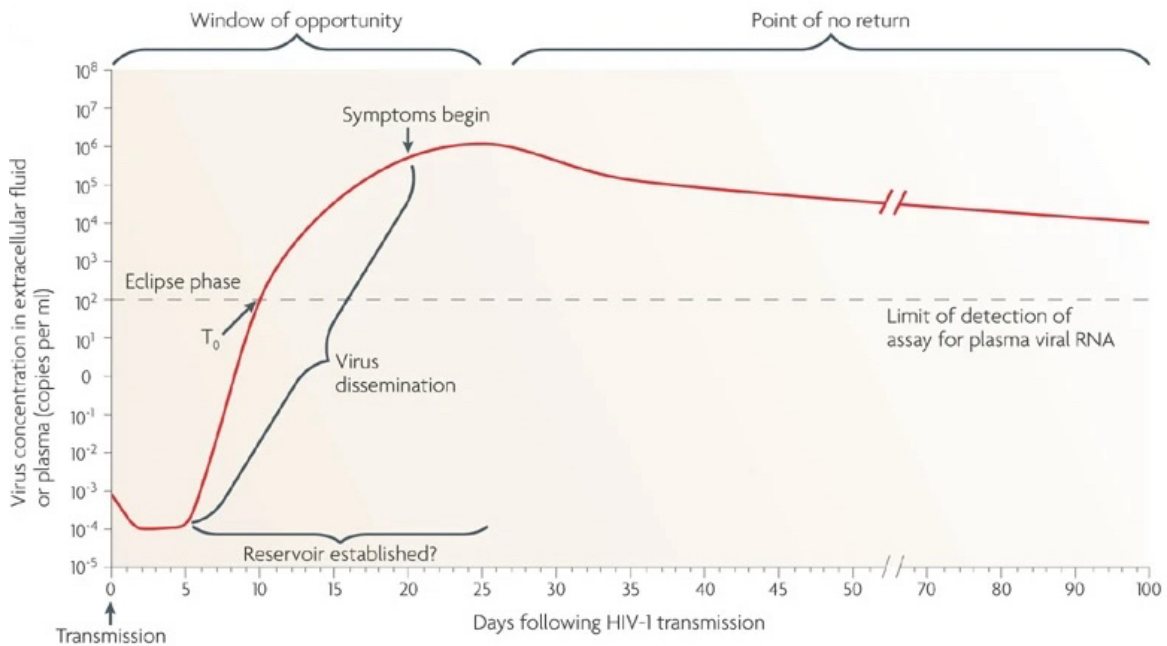


Figure 5. – Progression de la charge virale lors des premières semaines d'infection au VIH
Dans les premiers jours après l'infection, le VIH commence à se disséminer dans l'organisme et à établir son réservoir, bien avant que le virus ne soit détectable dans le sang. Les symptômes cliniques, eux, n'apparaissent en général qu'après 3 semaines (figure 1b tirée de McMichael et al., 2010).

1.2.2.1. Stades Fiebig

En 2003, afin de mieux comprendre l'évolution de l'infection durant la primo-infection, le laboratoire de Michael P. Busch analysa 580 échantillons de plasma de 85 PVVIH, prélevés à différents moments avant la séroconversion, c'est-à-dire avant que des anticorps spécifiques au VIH ne soient détectés. Cette équipe a ainsi établi que la phase aiguë de l'infection au VIH, suivant la phase d'éclipse, se distingue, selon la positivité de 4 essais diagnostiques, en 5 stades nommés stades Fiebig I à V (Fiebig et al., 2003) (Figure 6.).

- Durant le stade Fiebig I, qui se situe entre 10-15 jours PI, l'ARN viral dans le plasma est le seul marqueur détectable.

- Au stade Fiebig II, de 15-20 jours PI, les tests ELISA, qui détectent la présence de la protéine de capsid virale dans le plasma, sont positifs.
- Au stade Fiebig III, de 20-25 jours PI, en plus de l'ARN viral et de la p24+, des anticorps IgM VIH-spécifiques sont détectables dans le sérum.
- À partir du stade Fiebig IV, de 25-30 jours PI, les anticorps dirigés contre les protéines du VIH commencent à être décelés par Western Blot, bien que les résultats soient sous le seuil d'interprétabilité. Durant cette phase, deux des trois bandes correspondant aux anticorps contre la p24/gag, la gp41 ou la gp120 sont visibles.
- Finalement, le stade Fiebig V, qui débute environ un mois après l'infection, se caractérise par la détection des 3 bandes en Western Blot correspondant aux anticorps contre p24/gag, gp41 et gp120.

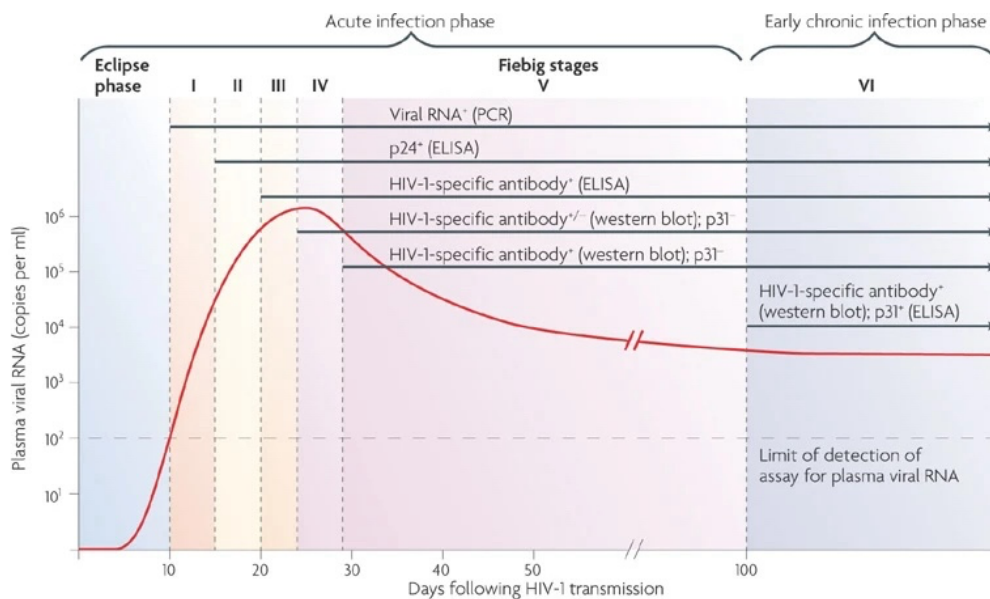


Figure 6. – Stades Fiebig de la primo-infection au VIH

Les stades Fiebig représentent l'évolution de la phase aiguë de l'infection au VIH en fonction de la détectabilité de différents essais diagnostiques (figure 1a tirée de McMichael et al., 2010).

1.2.2.2. Prophylaxie post-exposition

Une des particularités des premiers jours de la primo-infection au VIH est qu'elle est généralement asymptomatique et non détectable, même par les tests de RT-PCR, puisque la virémie n'apparaît qu'environ 10 jours après exposition (Fiebig I). Bien que le diagnostic précoce

soit pratiquement impossible, il est cependant concevable d'entamer une prophylaxie post-exposition (PEP) dans les trois jours suivant un évènement de transmission suspecté (Canada, 2022). En effet, la PEP se base sur l'idée que l'administration d'ARVs rapidement après la transmission préviendrait la dissémination et l'établissement du réservoir, permettant ainsi de prévenir l'infection (Omrani & Freedman, 2005). Ceci est particulièrement utile pour les gens ayant des comportements à risques (rapports sexuels non protégés, partage de seringue) ou les travailleurs de la santé exposés accidentellement (blessure avec du matériel contaminé) (Smith et al., 2005).

1.2.3. Phase chronique de l'infection

1.2.3.1. Phase chronique cliniquement asymptomatique

Environ quatre mois après l'évènement de transmission, la primo-infection fait place à la phase chronique cliniquement asymptomatique de l'infection. Durant cette phase, d'une durée variable allant de six mois à plus de 28 ans (moyenne de 10 ans), se caractérise par une absence de symptômes liés à l'infection au VIH, une charge virale plasmatique plutôt stable (Lyles et al., 2000) et une perte progressive des lymphocytes T CD4+ (Phillips et al., 1989). Cette phase, également décrite comme une période de latence clinique, se définit par l'absence de manifestation sur le plan clinique. Elle se poursuit jusqu'à l'apparition d'infections opportunistes, signe que le compte de cellules T CD4+ tend à descendre vers le seuil des 200 cellules par μl (revu dans Gurunathan et al., 2009).

1.2.3.2. Phase chronique symptomatique ou SIDA

Le compte CD4+ sert de mesure pour évaluer sommairement la fonction immunitaire d'une personne, et dans le cas du VIH, de l'évolution de la maladie. Cette perte progressive cellules lymphocytaires T CD4+ est possiblement le résultat de l'effet cytotoxique de la réplication virale et de l'activation immunitaire chronique engendrée par une telle infection virale (revu dans Vidya Vijayan et al., 2017). Typiquement, c'est une fois sous la barre des 200 CD4+ par μl , en absence d'initiation des ART, qu'arrive le dernier stade de l'infection au VIH : le syndrome d'immunodéficience acquise (revu dans Gurunathan et al., 2009). Au stade SIDA, la PVVIH est affectée par un nombre varié d'infections opportunistes (candidose; tuberculose; pneumonie à

Pneumocystis; cryptococcose; toxoplasmose; infections à *Mycobacterium*; histoplasmosse; CMV et Herpès Simplex symptomatiques) ((CDC), 2023), en raison de l'incapacité de monter une réponse immunitaire cellulaire, et ces infections, bénignes chez les personnes immunocompétentes, finiront par être fatales chez les personnes immunodéprimées (Kartikeyan et al., 2007; Chapter 5 - Immunopathology). Certains cancers (sarcome de Kaposi; différentes formes de lymphomes; cancer associé au virus du papillome humain (HPV)) sont plus fréquents, voir plus agressifs, chez les personnes au stade SIDA (revu dans (CDC), 2023; Yarchoan & Uldrick, 2018). Finalement, en absence de ART, des troubles neurocognitifs sont également rapportés (« HIV-associated neurocognitive disorders »; HAND), ayant des impacts variés allant de troubles mineurs jusqu'à la démence (revu dans McArthur et al., 2010).

1.2.3.3. Activation immunitaire chronique

L'infection au VIH est une pathologie chronique, puisque le pathogène n'est jamais totalement éliminé de l'organisme. De ce fait, le système immunitaire est stimulé continuellement, et de façon prolongée. Cette activation immunitaire chronique n'est pas totalement résolue par la prise de ART, puisque les PVVIH dont la virémie est contrôlée ont tout de même des niveaux d'activation immunitaire plus élevés que les personnes non-infectées (Almeida et al., 2002; Hunt et al., 2003). Ceci pourrait s'expliquer, entre autres, par le fait que les provirus latents, autant intacts que défectifs, peuvent produire des transcrits viraux à bas bruits (Pollack et al., 2017; Sannier et al., 2021; Wiegand et al., 2017) menant à une activation intracellulaire via des senseurs d'ARN, et même des protéines virales antigéniques (Cole et al., 2022; Ho et al., 2013; Imamichi et al., 2016; Imamichi et al., 2020).

1.2.3.4. Épuisement immunitaire

La réponse immunitaire étant un processus physiologique hautement régulé, entre autres pour prévenir l'apparition de maladies auto-immunes, la présence persistante d'un pathogène et de ses antigènes provoquent, avec le temps, l'épuisement immunitaire. D'abord décrit pour les cellules T CD8+ cytotoxiques (Wherry et al., 2003), ce phénomène se caractérise par une perte de fonction et de prolifération des lymphocytes T effecteurs des suites de l'accumulation de différents molécules de point de contrôle immunitaire (« immune checkpoint » en anglais) tels

PD-1 (« programmed death-1 »), LAG-3 (« lymphocyte activation gene 3 »), TIGIT (« T-cell immunoglobulin and ITIM domain »), Tim-3, CD160 et 2B4 (revu dans Wherry, 2011) (Figure 7.). Ces cellules, sur-stimulées, deviennent alors inefficaces. Chez les PVVIH, l'expression élevée de PD-1 sur les cellules T CD8+ spécifiques au VIH est signe d'un dysfonctionnement immunitaire (Trautmann et al., 2006) et est associé à la progression de l'infection (Day et al., 2006), tandis que son expression sur les cellules T CD4+ Gag-spécifiques corrèle plutôt avec la charge virale (D'Souza et al., 2007). Il en résulte donc que la réponse immunitaire envers les cellules infectées fait rapidement face à un épuisement. Cet épuisement immunitaire, en plus de l'apparition inévitable de mutations au niveau des épitopes reconnus par les lymphocytes T CD8+ cytotoxiques et les anticorps (Phillips et al., 1991), rendent quasi impossible un contrôle de la virémie à long terme (revu dans Fenwick et al., 2019).

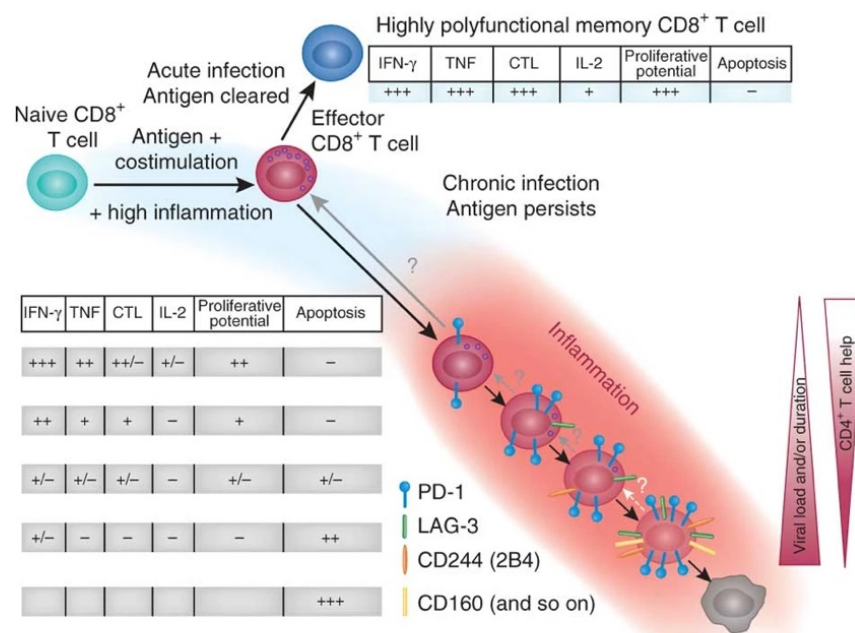


Figure 7. – Vers l'épuisement immunologique des T CD8+ cytotoxiques

L'épuisement immunologique est un processus où une cellule immunitaire, dont l'antigène persiste, acquière progressivement de plus en plus de molécules de point de contrôle immunitaire (PD-1, LAG-3, 2B4, CD160) tout en perdant de ses fonctions effectrices (production et sécrétion d'interféron gamma (IFN- γ), de TNF (« tumor necrosis factor ») et d'interleukine-2 (IL-2);

diminution de la capacité cytotoxique (CTL) et du potentiel de prolifération cellulaire; augmentation de la mort cellulaire par apoptose) (figure 1 tirée de Wherry, 2011).

1.3. Contrôle de la virémie

1.3.1. Les thérapies pharmacologiques actuelles : les antirétroviraux

Les trithérapies, soit la prise combinée de différentes classes d'antirétroviraux, ont drastiquement prolongé l'espérance de vie des personnes vivant avec le VIH, transformant l'infection par le VIH en une infection chronique qui peut être contrôlée efficacement grâce à la prise quotidienne d'antirétroviraux. Les antirétroviraux agissent à différents stades du cycle viral (revu dans Deeks et al., 2015). On distingue (Therrien & Lemire, 2022) (Figure 8.):

- Les inhibiteurs de liaisons, incluant l'agoniste CCR5 maraviroc et l'inhibiteur d'attachement fostemsavir;
- L'inhibiteur de fusion enfuvirtide;
- Les inhibiteurs de la transcriptase inverse, qui sont des analogues nucléosidiques (INTI, comprenant entre autres la lamivudine, le tenofovir et l'abacavir) ou non (INNTI, comme l'efavirenz et la nevirapine),
- Les inhibiteurs de l'intégrase que sont le raltegravir, le dolutegravir, le bictegravir et le cabotegravir (INI);
- Les inhibiteurs de protéase, tel le ritonavir qui inhibent la maturation des virions (IP);
- Et le plus récent, l'inhibiteur de capsid lenacapavir, qui interfère autant lors de l'infection que de la production de virions (Link et al., 2020), et qui est principalement utilisé dans les cas de résistance multiples aux autres ART (Segal-Maurer et al., 2022).

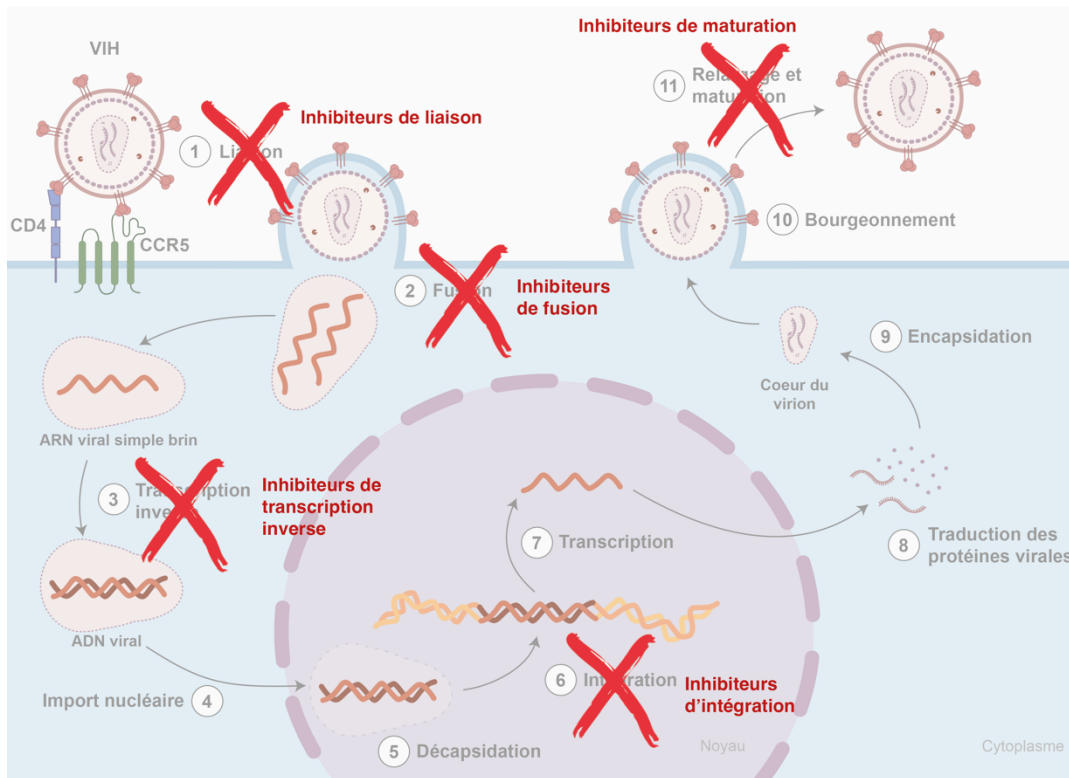


Figure 8. – Les différentes molécules antirétrovirales

Les différentes classes de ART interfèrent au niveau des étapes du cycle viral afin d'empêcher la production de nouvelles particules virales infectieuses (adaptée de Deeks et al., 2015).

Ces traitements doivent être pris en combinaison (2 molécules de 2 classes différentes au minimum), incluant généralement un inhibiteur d'intégrase (INI), et ce pour la durée de vie de la PVVIH (Gandhi et al., 2023). Depuis 2010, une étude auprès de 2499 participants hommes ou trans ayant des relations sexuelles avec des hommes a démontré que la prise orale d'un combiné d'ARVs (l'emtricitabine et le tenofovir, deux INTIs) avant une exposition au VIH (prophylaxie préexposition, ou PrEP) est également une méthode efficace de prévention (Grant et al., 2010). Depuis, plusieurs études et méta-analyses ont démontré la grande efficacité (plus de 95%) de la PrEP autant chez la population homosexuelle que chez les couples sérodiscordants et les utilisateurs de drogues injectables (Murchu et al., 2022).

Lorsque la charge virale plasmatique devient indétectable en analyse de routine grâce à la prise de ART, généralement en quelques semaines après de début du traitement, on parle de suppression de la virémie. De manière importante, cette charge virale contrôlée prévient la

transmission sexuelle du VIH : depuis 2018, il est reconnu qu'Indétectable égale Intransmissible, ou **I=I** (Rodger et al., 2019). La prise des ART a donc un double rôle de traitement pour la PVVIH, mais également de prévention pour autrui. En plus de promouvoir la détection rapide de l'infection, qui permet aussi de diminuer les risques de transmission, on recommande d'amorcer les traitements le plus rapidement possible, idéalement dans les sept jours suivant le diagnostic (Gandhi et al., 2023). L'initiation des ART dans le premier mois d'infection permet de limiter la taille du réservoir (Wyl et al., 2011) et de favoriser une plus grande décroissance de celui-ci au fil du temps (Buzon, Martin-Gayo, et al., 2014; Massanella, Ignacio, et al., 2021). Néanmoins, depuis 1999, il est établi que les ART ne permettent pas d'éradiquer le réservoir de cellules infectées (Davey et al., 1999): les ART actuels ne constituent donc pas un traitement curatif. Ce constat découle de deux observations: les cellules infectées qui sont non productivement actives ne sont pas éliminées par le système immunitaire, et celles-ci peuvent se réactiver et produire de nouveaux virions si les ART sont interrompus.

1.3.2. Les thérapies en développement

La guérison de l'infection par le VIH nécessitera donc une autre approche thérapeutique que la prise d'antirétroviraux à vie. Cette guérison peut, en théorie, être atteinte de deux façons : la guérison stérilisante consiste en l'élimination de tous les virus intégrés dans des cellules infectées, tandis que la guérison fonctionnelle constitue plutôt un cas de figure où tous les provirus du réservoir sont désormais inactivés, permettant alors une rémission de l'infection au VIH. Depuis le milieu des années 2010, deux grandes stratégies pour tendre vers l'une ou l'autre des formes de guérison ont été proposées (Figure 9.). Dans le « shock and kill » tout comme dans le « block and lock », l'objectif est le même : arriver au contrôle de la virémie à long terme, sans requérir à la prise d'antirétroviraux au quotidien.

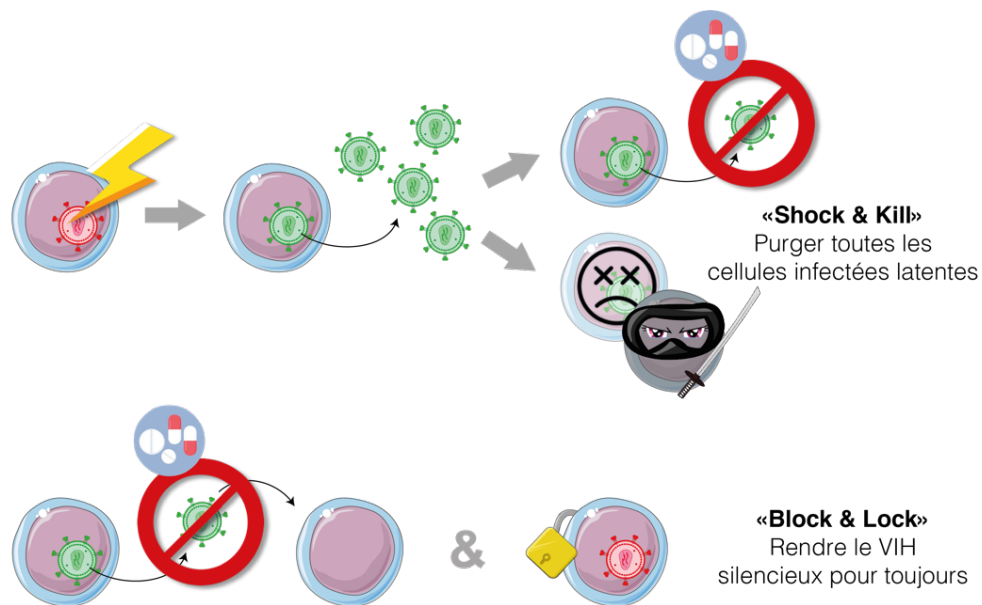


Figure 9. – Stratégies proposées visant à contrôler la réplication virale en absence de ART
Afin de contrôler la réplication virale sans nécessiter la prise régulière de ART, deux stratégies ont été proposées : le « shock & kill » qui vise à éradiquer les cellules infectées des réservoirs, et le « block & lock » qui cherche à rendre les provirus dans un état de latence profonde.

1.3.2.1. Le « shock and kill », pour purger les réservoirs

Le groupe de David M. Margolis fait la preuve de concept d'une efficacité potentielle de la stratégie « shock and kill » pour réduire les réservoirs viraux en 2012. Ainsi, ils démontrent pour la première fois chez l'Homme qu'il est possible d'induire la réactivation de la transcription dans les cellules latentes de PVVIH à l'aide d'un agent pharmacologique, le vorinostat (Archin et al., 2012). Cette molécule agit sur la répression épigénétique de l'ADN, en inhibant l'action de l'enzyme histone déacétylase (HDAC) qui limite l'accès du promoteur du VIH aux facteurs de transcription. Elle crée le « shock » qui sort les provirus de leur latence. Les cellules réactivées deviennent potentiellement visibles au système immunitaire et peuvent ensuite être éliminées (le « kill ») par les cellules cytotoxiques. De ce fait, il serait possible de réduire la taille du réservoir, ce qui pourrait contribuer à la guérison.

Depuis, plusieurs autres agents de réversion de la latence (LRA) ont été identifiés et agissent sur 2 des 4 blocages responsables de l'absence de production d'ARNm viraux (Ait-Ammar et al., 2019) (Figure 10.).

- L'initiation de la transcription (I): cette étape est hautement régulée, principalement par la présence de marques épigénétiques (déacétylation, méthylation), sur les histones ou sur l'ADN directement, qui rendent l'accès difficile au promoteur. Ces marques peuvent être modulées à l'aide d'inhibiteur d'HDAC (vorinostat/SAHA, panobinostat, romidepsin) (Archin et al., 2012; Rasmussen et al., 2013; Sogaard et al., 2015). De plus, la disponibilité de facteurs de transcriptions essentiels à l'initiation, tels que NF- κ B et NFAT, peut être augmentée à l'aide d'agoniste de PKC (prostratin, bryostatin et ingenol) (Jiang et al., 2014; Kulkosky et al., 2001; Mehla et al., 2010) ou de mimétiques de SMAC (Pache et al., 2015).
- L'élongation de la transcription (II): bien que la transcription puisse être initiée, seule une fraction des transcrits sont complets, puisque l'élongation est régulée par d'autres facteurs que ceux responsables de l'initiation de la transcription. Cette étape peut être favorisée en utilisant des agonistes du facteur d'élongation P-TEFb, tels que I-Bet et JQ1 (Bartholomeeusen et al., 2012; Darcis et al., 2015).

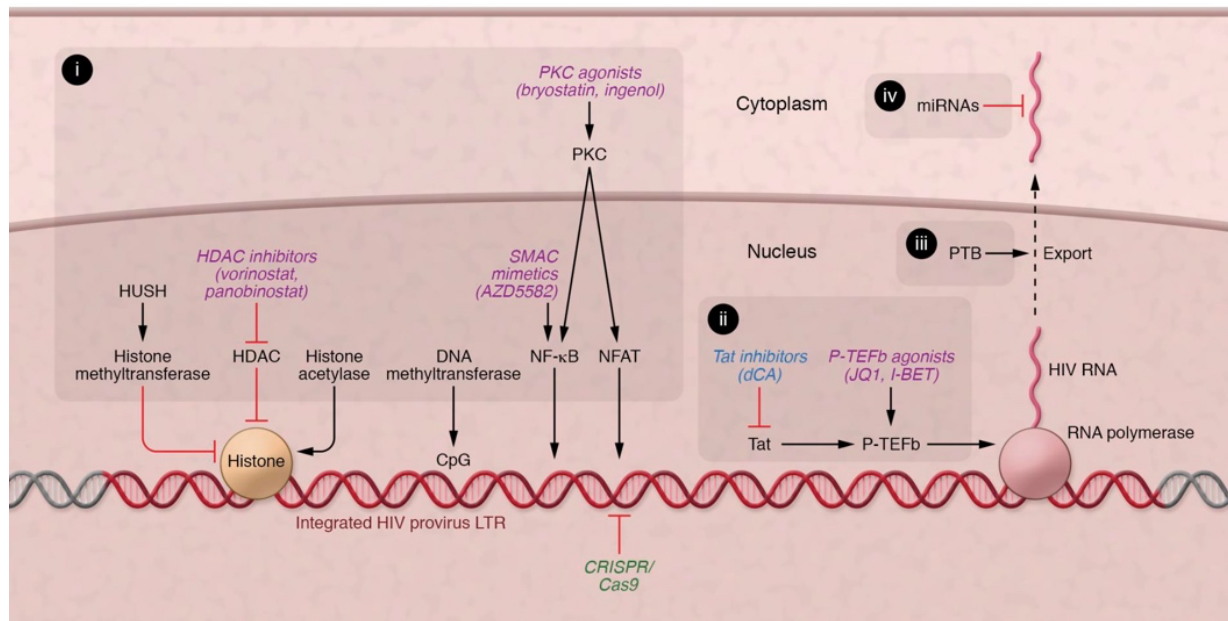


Figure 10. – Mécanismes d’action des principaux agents de réactivation de la latence

Le promoteur du VIH comporte plusieurs sites de liaison qui permettent à la fois de favoriser la latence transcriptionnelle et son activation. Les LRAs ciblent principalement ces zones régulatrices, impliquées dans l’initiation de la transcription (I). Les LRAs peuvent également agir sur d’autres étapes de la transcription, comme au niveau de l’élongation (II), de l’export vers le cytoplasme (III), et de la dégradation des ARNm (IV) (figure 3 tirée de Dufour et al., 2020).

Bien que ces différents LRA aient démontré leur efficacité *in vitro*, aucun n’a eu d’effet marqué sur la réduction de la taille du réservoir chez les PVVIH (revu dans Sengupta & Siliciano, 2018). Ceci s’explique probablement par le fait que la latence est multifactorielle et que la réactivation nécessiterait une combinaison de molécules. D’autre part, la plupart des LRA ont une action non-spécifique et activent massivement les cellules non infectées, causant une toxicité non-négligeable, ce qui nécessite de limiter le dosage *in vivo* (revu dans Pagani et al., 2022).

Au-delà du « shock », l’approche de « shock and kill » implique que les cellules ayant réactivé leur VIH soient éliminées par les cellules responsables de la réponse cytotoxique (CTL). Plusieurs études indiquent que la fonctionnalité des CTL spécifiques du VIH demeure altérée, même après des années d’ART (Archin et al., 2017; Elliott et al., 2014; Rasmussen et al., 2014; Shan et al., 2012; Sogaard et al., 2015), phénomène dû entre autres à la présence de mutations d’échappement

(Deng et al., 2015), à la perte d'expression des molécules du CMH de classe I à la surface des cellules infectées via l'action de Nef (Collins et al., 1998), et à l'épuisement immunitaire des cellules effectrices du CTL (Day et al., 2006). Il apparaît donc important d'augmenter la fonction effectrice des cellules cytotoxiques pour aboutir à un « shock and kill » efficace. Ceci pourrait être possible en combinant l'administration de LRA avec des immunothérapies tels des bloqueurs de molécules de point de contrôle immunitaire (anti-PD-1, anti-CTLA-4) (Fromentin et al., 2019; Rasmussen et al., 2021; Velu et al., 2022), des super-agonistes d'IL-15 (Miller et al., 2022; Webb et al., 2020) ou encore les agonistes de TLR-7 (Lim et al., 2018; SenGupta et al., 2021; Tsai et al., 2017) et de TLR-9 (Offersen et al., 2016; Vibholm et al., 2017; Vibholm et al., 2019; Winckelmann et al., 2013) afin de non seulement avoir un effet sur la réactivation, mais aussi sur la réponse anti-VIH des T CD4+, des T CD8+ et des cellules NK.

1.3.2.2. Le « block and lock », inactiver le VIH de façon permanente

La stratégie du « block and lock » a été proposée en 2015 lorsque l'équipe de Susana T. Valente a publié les effets favorables du didehydro-Cortistatin A (dCA), un inhibiteur de Tat (Mousseau et al., 2015). Cette molécule, utilisée *in vitro* en parallèle des ART sur des cellules de PVVIH, favorise la suppression de la charge virale, mais aussi force le maintien de la latence face à une stimulation (Kessing et al., 2017). Le dCA favoriserait même une reconfiguration épigénétique du promoteur du VIH avec le temps (C. Li et al., 2019). L'idée sous-jacente au « block and lock » n'est pas de purger l'organisme des cellules latentes, mais plutôt de forcer toutes les cellules infectées à rester dans une latence profonde, incapable de se réactiver une fois l'interruption des ART. D'autres méthodes de « block and lock » ont été proposées, telle l'édition génomique CRISPR, soit à l'aide de deux ARN-guides ciblant les LTR, permettant l'excision d'une grande partie du génome viral et empêchant ainsi sa réactivation (G. Wang et al., 2018), ou d'une Cas9 désactivée et fusionnée au domaine KRAB afin de forcer la répression de la transcription virale (Olson et al., 2020), ou encore l'utilisation du triptolide, une molécule issue d'une herbe qui promeut la dégradation de Tat via le protéasome (Wan & Chen, 2014). Néanmoins, cette approche reste limitée en raison de leur coût de fabrication des molécules, de leur toxicité et de leur manque de spécificité. De plus, l'efficacité d'inactivation du VIH par CRISPR, qui nécessite l'extraction ou l'inversion d'un fragment d'ADN viral, est très variable (Binda et al., 2020).

Finalement, aucune de ces méthodes n'a encore montré une réelle efficacité thérapeutique *in vivo* chez les PVVIH (revu dans Mediouni et al., 2022).

1.3.2.3. Les vaccins thérapeutiques et les anticorps neutralisants à large spectre

Les stratégies vaccinales n'ont pas non plus eu un énorme succès jusqu'à maintenant, principalement à cause du fait que les lymphocytes T CD8+ produits contre la protéine Env deviennent rapidement inefficaces des suites de l'apparition de mutations d'échappement (revu dans Goulder & Watkins, 2004), et que cet échappement à la reconnaissance peut également survenir chez les anticorps neutralisants (Wei et al., 2003). Cependant, les anticorps neutralisants à large spectre (bNAbs) permettent de contrer ce problème. Le premier bNAbs identifié, VRC01, est capable de neutraliser à lui seul 190 protéines d'Env différentes à une concentration inhibitrice médiane de 0,33 µg/ml (Wu et al., 2010). D'autres bNAbs, tous ciblant l'Env, mais à des endroits différents, ont été identifiés depuis, dont 10-1074, PGT121, 3BNC117, VRC07 et PGDM1400 (Figure 11.)

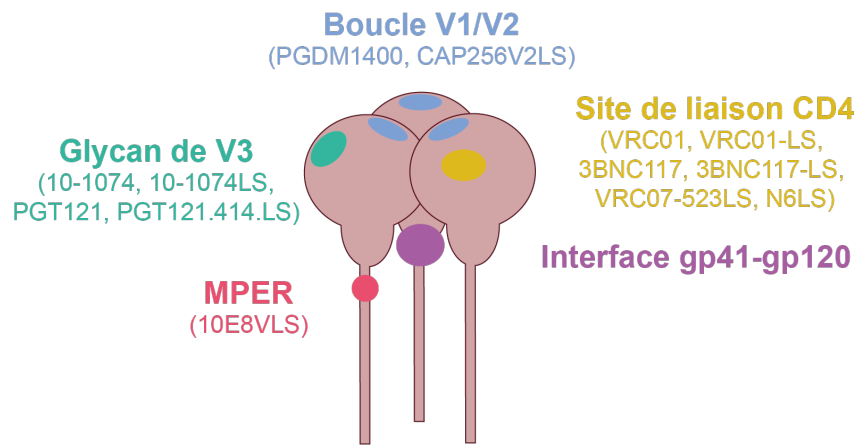


Figure 11. – Cibles des différents bNAbs sur le trimère de l'Env

Jusqu'à maintenant, cinq régions du trimère de l'Env ont été identifiées comme des cibles de bNAbs. Les différents bNAbs ainsi catégorisés y sont listés (adaptée de Hsu et al., 2021).

Les bNAbs sont également polyvalents dans leur action dans la lutte au VIH. Ils peuvent autant servir de méthode prophylactique (Corey et al., 2021) que d'alternative aux ART pour le contrôle de la réplication virale (Gaebler et al., 2022; Sneller et al., 2022), mais également comme stratégie

curative. En effet, l'utilisation de bNAbs peut favoriser le déclin du réservoir intact, limiter l'expansion clonale des cellules infectées qui sont réactivées, et améliorer la réponse des lymphocytes T CD8+ VIH-spécifiques (Gaebler et al., 2022; Niessl et al., 2020). Par contre, le plus gros défi reste que les bNAbs sont rarement produits chez une PVVIH. Ce sont des anticorps qui doivent subir plusieurs étapes de maturation sur des années afin d'acquérir les quelques rares mutations les rendant si polyvalents. Dans les dernières années, et particulièrement depuis l'arrivée de la technologie des vaccins à ARNm depuis la COVID-19, des équipes tentent de développer des approches de vaccinations successives à l'aide d'immunogènes variés, permettant de cibler d'abord les précurseurs des bNAbs, et d'ensuite induire les mutations nécessaires (Williams et al., 2021).

1.3.3. Contrôleurs

Une guérison fonctionnelle est définie par un contrôle de la virémie sans la nécessité de prendre la ART. Ce modèle est inspiré par quelques rares PVVIH pouvant contrôler naturellement leur charge virale pendant des années en absence de ART: on les appelle les contrôleurs (Figure 12.).

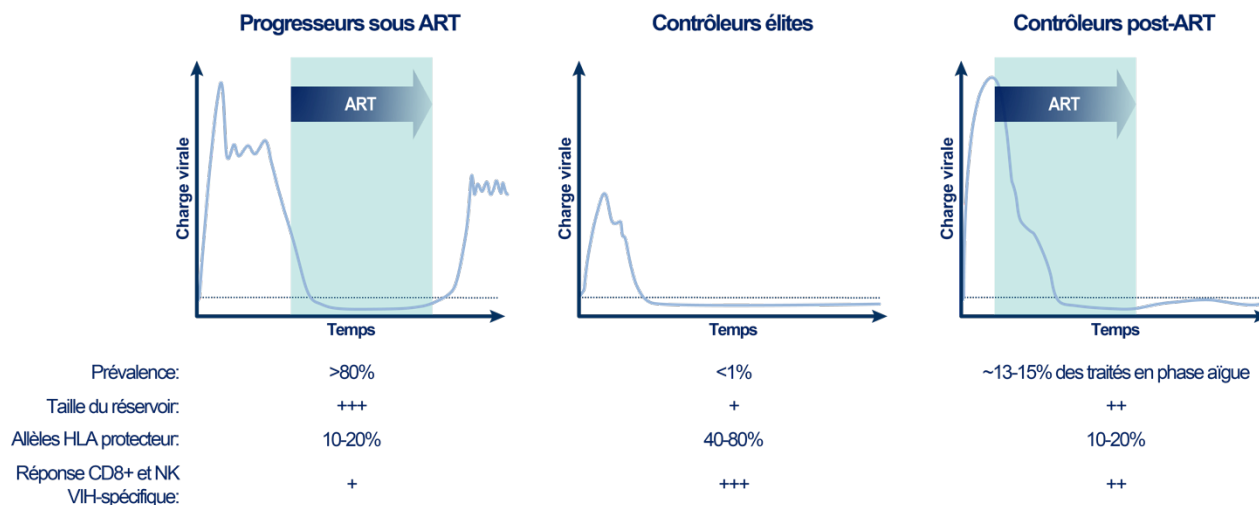


Figure 12. – Les différents profils de progression à l'infection au VIH

Chez les progresseurs (>80% des PVVIH), le contrôle de la charge virale n'est atteint qu'après l'initiation des ART. Il existe une minorité de contrôleurs élités, chez qui la charge virale est sous contrôle pendant des années en absence de ART. Les contrôleurs post-traitements, quant à eux,

ont débuté ART durant la phase aigüe de l'infection, et développent un contrôle de la virémie après une TI (interruption de traitement) (adaptée de Li & Blankson, 2021).

1.3.3.1. Contrôleurs élités

Les contrôleurs élités sont des PVVIH dont la charge virale est indétectable (<50 copies par ml de plasma) durant des années, et ce, sans avoir recours à des antirétroviraux pour y parvenir, et sans développer d'immunodéficience (Deeks & Walker, 2007). Ce contrôle hors du commun a été grandement étudié, et les principales caractéristiques des contrôleurs élités résident dans leur immunité cellulaire: ils possèdent souvent des haplotypes HLA dits protecteurs (HLA-B*27, B*57 et B*14) (International et al., 2010), ont d'excellentes réponses VIH-spécifiques de leurs cellules T CD8+ (Betts et al., 2006) et possèdent souvent de bonnes fonctions anti-VIH de leurs cellules NK mémoires ainsi qu'une réponse ADCC (« antigen dependent cellular cytotoxicity ») efficace (Sánchez-Gaona et al., 2022). Cette réponse immunitaire est fort probablement responsable du fait que les provirus intacts des contrôleurs élités sont surtout intégrés dans des portions d'ADN favorisant la latence profonde (Jiang et al., 2020).

1.3.3.2. Contrôleurs post-traitements

Les efforts de recherche menant à développer des traitements curatifs contre l'infection à VIH ont nécessité des études cliniques avec une interruption de traitement (TI) hautement monitorée. En effet, une des méthodes pour évaluer si le réservoir est impacté par l'intervention est de mesurer le temps avant le rebond de la charge virale et sa magnitude. C'est ainsi qu'un autre type de contrôleur a été découvert grâce à la cohorte VISCONTI (« Viro-Immunological Sustained CONTROL after Treatment Interruption ») en 2013: les contrôleurs post-traitements (Saez-Cirion et al., 2013). Ces contrôleurs sont définis par le fait qu'ils maintiennent une charge virale <400 copies par ml pendant au moins 24 mois après la TI (Lodi et al., 2012; Namazi et al., 2018). La plupart des contrôleurs post-traitement ont en commun d'avoir initié leur ART dans la phase aigüe de l'infection (Saez-Cirion et al., 2013) et d'avoir été plus longtemps sous traitement avant le TI (Stohr et al., 2013). Curieusement, ces contrôleurs possèdent souvent des allèles HLA associés à un mauvais pronostic clinique, et ont charge virale plus élevée que la moyenne avant l'initiation des ART (Saez-Cirion et al., 2013). En revanche, lors de TI, ces contrôleurs sont

caractérisés par un plus petit réservoir (Assoumou et al., 2015), à une excellente réponse cytotoxique VIH-spécifiques de leurs cellules T CD8+ et de leurs cellules NK (Climent et al., 2022; Samri et al., 2016), ainsi qu'à la présence d'une plus grande quantité de T CD4+ spécifiques à la protéine Gag (Etemad et al., 2023), suggérant l'implication de ces cellules immunitaires dans le contrôle prolongé de la virémie post-interruption. Les contrôleurs post-traitements montrent également un profil de transcription virale particulier : ils ont moins d'ARN viraux complètement épissés, particulièrement de Tat-Rev, et d'ARN viraux polyadénylés durant l'interruption de ART, comparativement aux non-contrôleurs (Wedrychowski et al., 2023). Finalement, il semble que la majorité de leurs provirus intacts soient intégrés dans des régions de l'ADN faiblement activé, favorisant leur latence profonde (Lian et al., 2023).

1.3.4. Greffe de cellules souches hématopoïétiques CCR5 Δ 32

Timothy Ray Brown, connu sous le nom du "patient de Berlin", fut la première personne considérée guérie du VIH. Cette guérison est survenue après deux greffes allogéniques de cellules souches hématopoïétiques (« hematopoietic stem-cell transplant »; HSCT) provenant d'un donneur homozygote pour la mutation Δ 32 sur l'allèle de CCR5 (Hutter et al., 2009). Cette délétion de 32 pb au sein du gène codant pour le corécepteur du VIH occasionne un changement de cadre de lecture : il en résulte la transcription d'un récepteur tronqué et non-fonctionnel, et ceci a pour impact d'empêcher l'entrée du virus dans la cellule (Liu et al., 1996; Samson et al., 1996). Cette mutation allélique est surtout retrouvée parmi les Caucasiens, soit chez environ 10 % de la population caucasienne de l'Europe et de l'est de l'Asie à l'état hétérozygote (Novembre et al., 2005). M. Brown a subi deux greffes de cellules souches à titre d'intervention contre une leucémie myéloïde aigüe, puisque ce transplant permet non seulement d'éliminer les cellules cancéreuses, mais aussi de reconstruire un système immunitaire avec des cellules lymphocytaires saines. Son oncologue, Dr Gero Hütter, eut cependant l'idée de trouver un donneur compatible possédant la mutation CCR5 Δ 32 à l'état homozygote: puisque les personnes qui sont homozygotes pour cet allèle sont naturellement résistantes à l'infection au VIH, l'utilisation de cellules souches CCR5 Δ 32 a permis de repeupler l'organisme avec des cellules cibles dans lesquelles le virus ne peut entrer. C'est ainsi que le patient de Berlin, qui arrêta tout ART au moment de l'intervention, fut déclaré en rémission de son infection au VIH 20 mois après sa

deuxième greffe, puisqu'aucune trace d'ADN ou d'ARN viral ne put être détectée (Hutter et al., 2009). Il demeura avec une charge virale indétectable pendant 13 ans, soit jusqu'à son décès, imputable à la résurgence de sa leucémie, en septembre 2020 (Russell, 2020). Il a fallu attendre sept ans pour qu'un deuxième cas de rémission par greffe CCR5Δ32, le patient de Düsseldorf, soit rapporté au cours de la « Conference of Retroviruses and Opportunistic Infection » (CROI) de 2016 (Jensen et al., 2023; Kobbe et al., 2016), suivi en 2019 d'Adam Castillejo, le patient de Londres (Gupta et al., 2019). Deux autres cas sont venus s'ajouter en 2022 : le patient de City of Hope, présenté durant la conférence AIDS de l'« International AIDS Society » (IAS) (Dickter et al., 2022), ainsi que le premier cas de rémission chez une femme d'ethnicité mixte, la patiente de New York, grâce à l'utilisation de cellules de sang de cordon (Hsu et al., 2023). Puisque la mutation CCR5Δ32 est excessivement rare chez les non-Caucasiens, rendant ardue la tâche de trouver un donneur compatible avec la mutation, l'utilisation de sang de cordon permet tout de même d'accomplir une greffe de moelle osseuse malgré une compatibilité partielle du transplant avec le receveur.

Il va sans dire que la greffe HSCT CCR5Δ32 n'est pas la solution pour guérir toutes les PVVIH. À ce jour, on comptabilise 5 personnes considérées comme guéries du VIH des suites d'une greffe HSCT, mais ceci ne représente que les rares cas pour lesquels la procédure a fonctionné. Parmi les tentatives infructueuses, on dénote 6 décès de PVVIH dans l'année suivant la transplantation, ou sinon un rebond de la charge virale dans les 3 à 32 semaines post-interruption de traitement antirétroviral dans 3 cas (rapporté dans Hutter, 2014), bien que la taille de leur réservoir ait été significativement réduite par la greffe (Henrich et al., 2014; Kordelas et al., 2014). Cependant, le patient de Berlin et les 4 autres « patients » guéris sont devenus la preuve de concept démontrant la faisabilité d'une guérison.

1.3.5. Rémission naturelle

En 2020, les laboratoires de Mathias Lichterfeld et de Xu G. Yu publiaient une découverte intéressante observée chez une cohorte de contrôleurs élites. Ils ont effectué une caractérisation génotypique du réservoir circulant chez une de leurs participantes ayant maintenu une charge virale indétectable pendant plus de 24 ans sans ART: sur plus de 1,5 milliard de PBMCs, ils n'ont trouvé que 19 provirus, tous défectifs (Jiang et al., 2020). Loreen Willenberg, qu'on nomma

d’abord la Patiente de San Francisco, s’avérait être le premier cas de rémission naturelle. L’année suivante, la patiente Esperanza, une autre contrôleuse élite de 38 ans, fut présentée comme le deuxième cas de rémission naturelle suite à l’incapacité d’identifier de réservoir génétiquement intact ou compétent pour la réplication parmi 1,2 milliard de PBMCs (Turk et al., 2021). La patiente Esperanza a maintenu une charge virale indétectable pendant 8 ans et n’a été sous ART que pendant 6 mois lors de sa première grossesse (Turk et al., 2021). L’année suivante, lors de la conférence internationale AIDS, tenue à Montréal, on présenta la patiente de Barcelone (Climent et al., 2022). Ce troisième cas de rémission naturelle diffère des deux autres puisqu’il s’agit ici d’une contrôleuse post-traitement, qui contrôle toujours sa virémie plus de 15 ans après son TI (Climent et al., 2022) (Figure 13.).

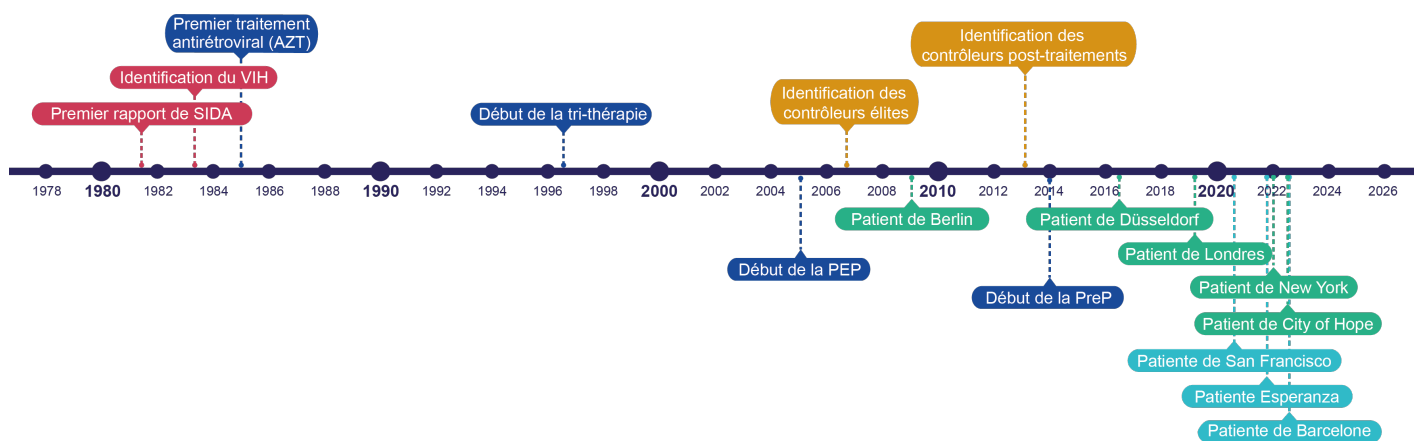


Figure 13. – Ligne du temps du début de la pandémie à aujourd’hui

Les années 80 représentent le début de la pandémie (1981) et l’identification du VIH (1983). Les traitements antirétroviraux ont fait leur apparition dès 1985, mais ce n’est qu’en 1996 que fut démontrée l’efficacité de la trithérapie. Depuis 2006, la recherche sur le VIH a permis d’identifier autant les contrôleurs élités (2006) que les contrôleurs post-traitements (2013), tout en rapportant les premiers cas de guérison (2009 à 2023).

1.4. Réservoir viral

1.4.1. Définition du réservoir

1.4.1.1. Persistance

Le VIH n'est pas éliminé malgré des années de ART efficace (Finzi et al., 1997; Wong et al., 1997). Tel que vu précédemment (point 1.3.1), les ART agissent à différents stades du cycle viral afin d'empêcher la réplication active du virus, ce qui fait en sorte que la charge virale plasmatique devient indétectable dans les méthodes diagnostiques de routine (soit moins de 20-40 copies d'ARN par ml de plasma). Cependant, chez la très grande majorité des PVVIH, une interruption des traitements antirétroviraux (TI pour « treatment interruption ») mène inmanquablement à un rebond de la charge virale, qui redevient détectable en moyenne 2 à 3 semaines suivant l'interruption (Davey et al., 1999) (Figure 14.). Les PVVIH doivent donc prendre des ART à vie et de façon continue afin de contenir la réplication au sein des cellules infectées, qui sont maintenues dans le temps et qui constituent le réservoir de VIH.

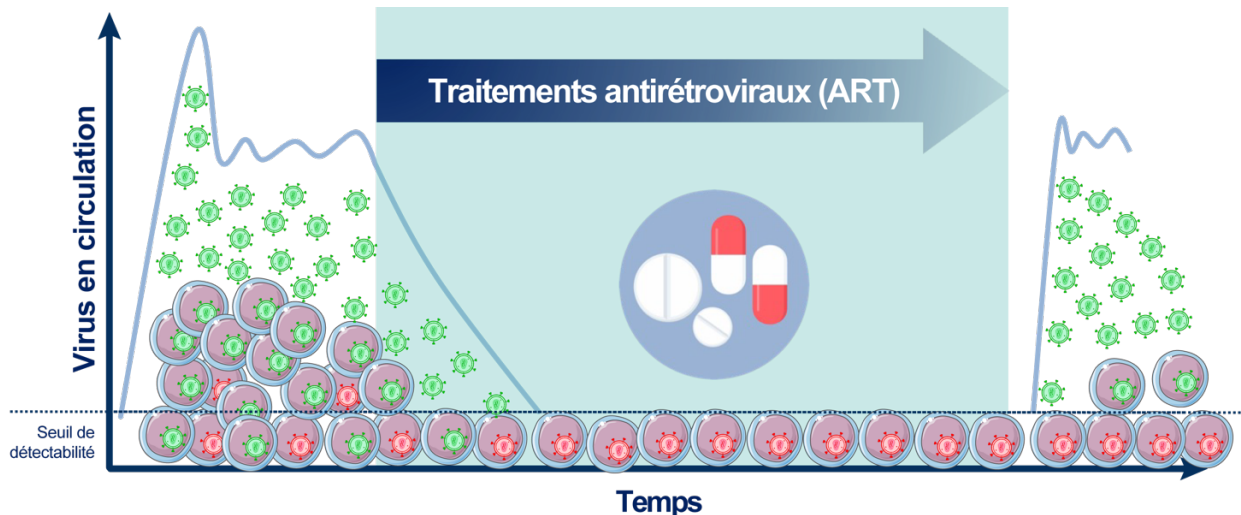


Figure 14. – Représentation de l'évolution de la charge virale plasmatique
Avant l'initiation des ART, le lot de cellules infectées est composé de cellules productives et de cellules latentes. Une fois la charge virale réduite par les ART, la quantité de virus en circulation se retrouve sous le seuil de la détectabilité, et on ne retrouve que des cellules infectées dans leur état de latence. L'arrêt des ART mène à un retour de la charge virale détectable qui témoigne de

la dissémination virale depuis les réservoirs (adaptée de Kulpa & Chomont, 2015). [Cellules avec un virus vert = cellule productivement infectée; cellules avec un virus rouge = cellule avec un virus latent].

1.4.1.2. Latence

La persistance du VIH, malgré la prise de ART pendant des années, est due à la présence de génomes viraux latents intégrés au sein d'un petit nombre de lymphocytes T CD4+ (Chun et al., 1995; Chun, Stuyver, et al., 1997; Finzi et al., 1997; Wong et al., 1997). La latence se définit comme un état d'infection non productif et réversible, où le VIH ne produit pas de nouveaux virions. De ce fait, puisque les ARVs n'agissent que sur des étapes de la réplication virale, ils n'ont aucun impact sur les génomes de VIH intégrés en état de latence. À la différence d'autres virus, comme l'herpès simplex (Nicoll et al., 2016), le VIH ne code pour aucune protéine qui induit activement cet état de latence. C'est plutôt le résultat de facteurs multiples, entre autres liés à l'endroit dans le génome cellulaire où il est intégré (aussi appelé site d'intégration) (Einkauf et al., 2019; Einkauf et al., 2022; Han et al., 2004; Jiang et al., 2020; Lenasi et al., 2008), au manque de disponibilité des facteurs de transcription essentiels (Barboric et al., 2001; Kao et al., 1987; Lassen et al., 2004; Van Lint et al., 1997; Yukl et al., 2018), à l'environnement épigénétique qui limite l'accès au promoteur (Archin et al., 2009; Chougui et al., 2018; Coull et al., 2000; Friedman et al., 2011; Kauder et al., 2009; Lusic et al., 2003; Sheridan et al., 1997; Van Lint et al., 1996; Verdin et al., 1993; Yurkovetskiy et al., 2018), et à l'état d'activation intrinsèque de la cellule où il se trouve (Evans et al., 2013; Kulpa et al., 2019; Kumar et al., 2015). Alors que les cellules productivement infectées sont rapidement éliminées (demi-vie d'environ 2 jours) (Ho et al., 1995; Wei et al., 1995), principalement par la réponse immunitaire cytotoxique, la latence du VIH lui permet de demeurer invisible au système immunitaire, et donc de persister (revu dans Siliciano & Siliciano, 2021).

Le réservoir viral est constitué des cellules infectées et latentes qui sont générées dès le début de l'infection (Gantner et al., 2023; Procopio et al., 2015), mais dont on ne peut mesurer l'ampleur qu'une fois la charge virale réduite par la prise de ART. Ainsi, avant la prise d'antirétroviraux et dans les premiers mois de ART (Rosenbloom et al., 2017), le réservoir de cellules infectées

latentes est minoritaire par rapport aux cellules productivement infectées (Blankson et al., 2000) ou à celles dans lesquelles l'ADN viral n'est pas intégré (cercles 2-LTR) (Pierson et al., 2002).

Le réservoir latent constitue une sorte d'archive des virus présents au moment de l'initiation des traitements (Abrahams et al., 2019; Hermankova et al., 2001) et est souvent présenté comme la somme de toutes les cellules infectées qui persistent. Cela dit, tous les provirus persistants ne sont pas équivalents. Si l'on considère le réservoir comme étant la source du rebond de la charge virale, il se définit plutôt par la somme des quelques cellules dans lesquelles un provirus est capable de se réactiver et de produire de nouvelles particules virales (Blankson et al., 2002). Ces provirus sont donc à la fois intacts et capables de sortir de leur état de latence.

1.4.1.3. Intégrité du réservoir

Un grand nombre de mutations sont introduites lors de la conversion de l'ARN viral en ADN. Ces défauts sont si fréquents que le réservoir est composé à plus de 90 % de provirus défectifs (Bruner et al., 2016; Chun, Carruth, et al., 1997; Hiener et al., 2017; Ho et al., 2013; Lee et al., 2017), c'est-à-dire de génomes qui ne peuvent générer des particules virales infectieuses. De ces études, plusieurs types de défauts ont été recensés.

Les inversions et les grandes délétions internes sont causées par le changement de brin matrice lors de la rétro-transcription, puisque la transcriptase inverse saute entre les 2 brins d'ARN présents dans le cœur viral à deux reprises afin de former les fragments d'ADN homologue (revu dans Hu & Hughes, 2012) (Figure 15.).

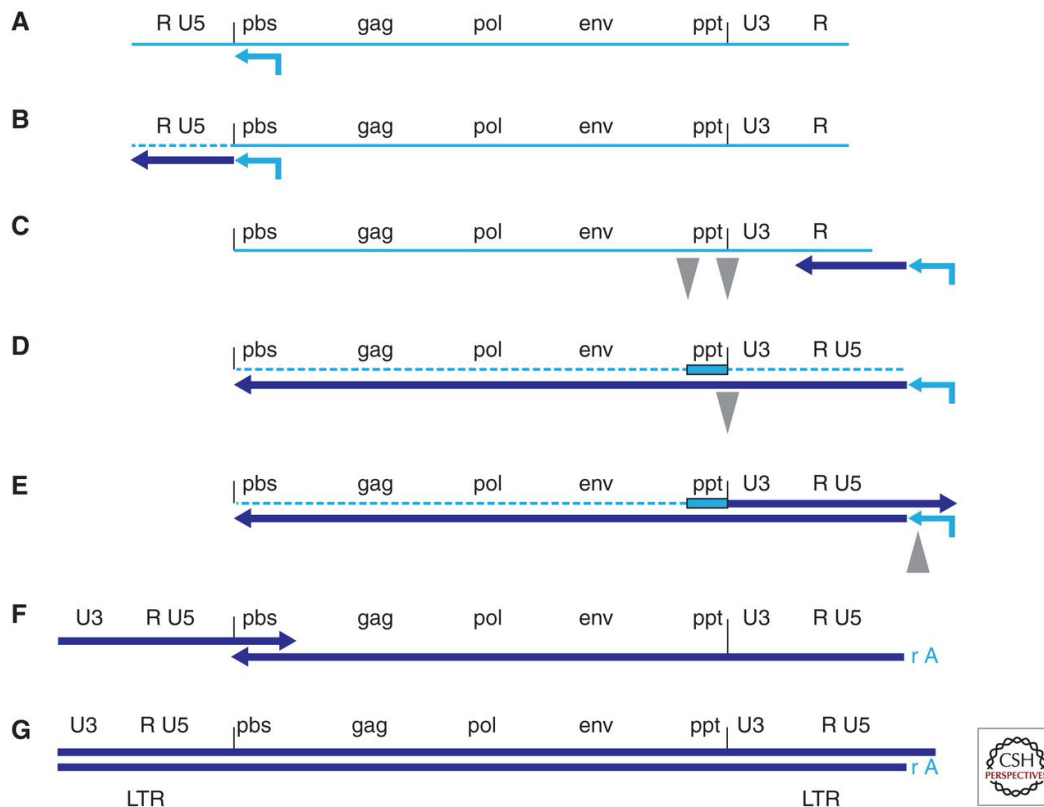


Figure 15. – Schéma du processus de transcription inverse

Les différentes étapes de la transcription inverse du VIH de l'ARN simple-brin (bleu clair) en ADN double-brin (bleu foncé) : l'initiation, à partir du site PBS en aval du 5'LTR sur l'ARN viral (A), la synthèse du premier brin d'ADN viral en 3'-5' pour compléter la séquence du LTR (B), le premier transfert de brin - vers le 3'LTR de l'ARN viral (C), l'élongation 3'-5' de l'ADN viral du brin - jusqu'au PBS et dégradation de l'ARN viral (trait hachuré) (D), la synthèse du brin + à partir du ppt (« polypurine tract »), une séquence d'ARN résistante à la RNase qui sert d'amorce pour la synthèse 5'-3' du LTR (E), le deuxième transfert de brin vers le PBS en aval du 5'LTR (F) et finalement, la complétion de la synthèse du brin + (G) (figure 1 tirée de Hu & Hughes, 2012).

Les défauts génétiques peuvent aussi provenir de l'action d'APOBEC3G, qui induit l'accumulation de mutations G→A appelées hypermutations, si ce facteur de restriction n'est pas inhibé par la protéine virale Vif (Sheehy et al., 2002). L'accumulation d'hypermutations provoque l'apparition de plusieurs codons-stops prématurés au sein des gènes viraux. Finalement, la transcriptase inverse est une polymérase ayant un taux d'erreur élevé, de 0,3 nucléotide par génome viral par

cycle de réplication (Mansky & Temin, 1995). Ce taux d'erreur favorise l'évolution du virus et son échappement à la réponse immunitaire, mais augmente les probabilités d'induire de petites délétions ou des mutations ponctuelles. Ces défauts peuvent causer des changements de cadres de lecture et l'apparition de codons-stops prématurés, mais également des modifications dans la structure ARN des régions non-codantes du virus, principalement au niveau du locus Ψ (Ho et al., 2013).

L'intégrité génétique est essentielle au potentiel réplicatif des provirus latents. En effet, seuls les provirus génétiquement intacts sont considérés comme potentiellement compétents pour la réplication (Finzi et al., 1997; Ho et al., 2013; Wong et al., 1997). Cependant, il a été démontré dans les dernières années que les virus défectifs peuvent tout de même produire des transcrits viraux, des protéines et même être impliqués dans la virémie résiduelle observée chez certaines personnes sous ART (Cole et al., 2022; Imamichi et al., 2016; Imamichi et al., 2020; Sannier et al., 2021; White et al., 2023).

1.4.1.4. Réactivation

L'intégrité génétique n'est pourtant pas le seul aspect essentiel pour qu'un provirus soit compétent pour la réplication. Il faut également que ce virus soit capable de sortir de son état de latence (revu dans Cicilionyte et al., 2021). Effectivement, un provirus intact, potentiellement compétent pour la réplication, peut se trouver dans un état de latence profonde duquel il ne pourra pas être extirpé (Einkauf et al., 2019; Einkauf et al., 2022). Bien qu'il possède tous les gènes pour produire des particules virales infectieuses, ce provirus n'aura peu, voir pas, de rôle à jouer dans le rebond de la charge virale si sa transcription ne peut pas être activée (Lian et al., 2021).

D'autre part, les virus responsables du rebond peuvent provenir d'évènements recombinaisons (Cohen et al., 2018; Kemp et al., 2022; Lu et al., 2018). La recombinaison, comme son nom le suggère, est issue d'un assemblage entre 2 génomes viraux. Elle survient durant le cycle de réplication, lorsque la transcriptase inverse saute d'un brin d'ARN à l'autre pour synthétiser l'ADNg (Delviks-Frankenberry et al., 2011; Jetzt et al., 2000). Ce phénomène peut permettre, entre autres, de réparer des génomes viraux défectifs par complémentation (Clavel et al., 1989).

1.4.2. Réservoir anatomique

1.4.2.1. Tissus et organes qui constituent le réservoir

Bien que certaines séquences virales responsables du rebond soient détectées dans les cellules T CD4+ infectées en circulation durant les ART (Kearney et al., 2016), plusieurs études ont suggéré que le rebond viral proviendrait surtout de réservoirs tissulaires contenant des cellules à longue durée de vie, comme les ganglions lymphatiques (De Scheerder et al., 2019; Lee et al., 2020; Lorenzo-Redondo et al., 2016; Rothenberger et al., 2015). Ces tissus contiennent des cellules infectées avec un provirus latent, intact et compétent pour la réplication, et capable d'être réactivé pour relancer la virémie (De Scheerder et al., 2019). Néanmoins, pour des raisons éthiques évidentes, le principal compartiment anatomique étudié chez l'humain est le sang, plus facilement accessible.

Il y a cependant plusieurs éléments qui distinguent le compartiment sanguin des tissus profonds. En premier lieu, les cellules T CD4+ en circulation ne représentent qu'environ 2 % de la population totale de lymphocytes T CD4+ chez un individu (Ganusov & De Boer, 2007). De plus, les organes sont composés d'autres types cellulaires, et certaines de ces cellules expriment également CD4 et CCR5/CXCR4, les rendant possiblement susceptibles à l'infection, ce qui en fait donc de potentiels réservoirs. En effet, les cellules myéloïdes, principalement les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC) (Fong et al., 2002) et les macrophages (Gartner et al., 1986; Igarashi et al., 2001), peuvent être infectées par le VIH. De plus, les macrophages constituent une population cellulaire diversifiée selon leur localisation anatomique (Figure 16.). Plus particulièrement, de l'ADN de VIH a été détecté dans les macrophages du cerveau (microglies: Avalos et al., 2017; Churchill et al., 2006; Cosenza et al., 2002; Ko et al., 2019; Valdebenito et al., 2021), du foie (cellules de Kupffer: Kandathil et al., 2018), des poumons (macrophages alvéolaires: Clarke et al., 1994; Costiniuk et al., 2018; Cribbs et al., 2015; Jambo et al., 2014; Lambotte et al., 2000), du tractus génital (Deleage et al., 2011; Ganor et al., 2019; Shen et al., 2009), du système digestif (Yukl et al., 2014; Zalar et al., 2010) et même du tissu adipeux (Damouche et al., 2015). Jusqu'à présent, les réservoirs tissulaires du VIH qui ont été étudiés chez l'humain comprennent :

- L'intestin (Chun et al., 2008; Imamichi et al., 2011; Yukl et al., 2010);

- Le foie (Blackard et al., 2011);
- Le système nerveux central (Kumar et al., 2007; Lamers et al., 2016);
- Les ganglions lymphatiques (Banga et al., 2016; Gunthard et al., 2001; Lorenzo-Redondo et al., 2016);
- Les testicules (Jenabian et al., 2016; Miller et al., 2019);
- Les poumons (Clarke et al., 1994; Costiniuk et al., 2018; Cribbs et al., 2015; Jambo et al., 2014; Lambotte et al., 2000; Meziane et al., 2020);
- La rate (Nolan et al., 2018);
- L'appendice (Liu et al., 2022).

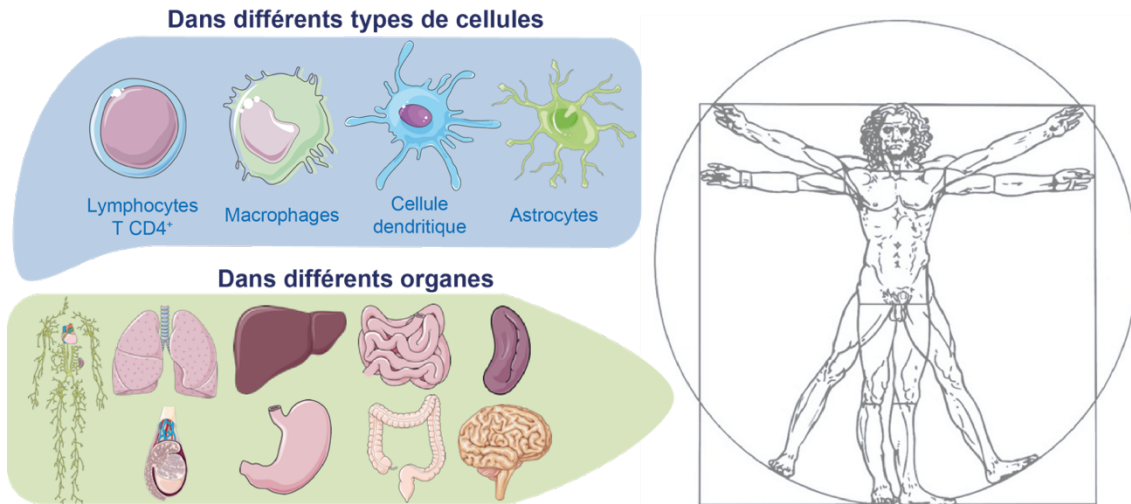


Figure 16. – Localisation des réservoirs de cellules infectées par le VIH au niveau cellulaire et tissulaire

Le VIH peut se retrouver dans plusieurs types cellulaires différents, et ces cellules seront réparties dans plusieurs compartiments anatomiques.

1.4.2.2. Sanctuaires et compartimentalisation

En plus d'être composé de différentes cellules et d'avoir une fonction propre, chaque organe est un milieu biologique distinct. Certains tissus profonds sont considérés comme des sites sanctuaires du VIH : on peut y détecter une production virale résiduelle à bas bruit, menant parfois même à une réplication virale (Kepler & Perelson, 1998). Cette réplication résiduelle est la résultante de deux phénomènes. D'une part, certains organes, comme l'intestin (Yukl et al.,

2010) ou les testicules (Jenabian et al., 2016), sont des zones immunitaires privilégiées, c'est-à-dire que la pression immunitaire y est moins élevée. D'autre part, le système nerveux central (Lamers et al., 2016) et les ganglions lymphatiques (Fukazawa et al., 2015; Lorenzo-Redondo et al., 2016; Rosen et al., 2022), en plus d'être aussi un environnement immunitaire privilégié, sont connus pour être plus difficiles d'accès pour plusieurs médicaments, entre autres à cause de la présence de pompes d'efflux (Nau et al., 2010), et il n'est pas rare d'y mesurer de plus faibles concentrations des ART que dans le plasma (Fletcher et al., 2014).

Ces caractéristiques, propres aux tissus, soulèvent la possibilité d'observer des populations provirales circonscrites à un seul compartiment anatomique et distinctes des génomes de VIH retrouvés dans le sang : on parle alors de compartimentalisation du réservoir. La compartimentalisation serait entre autres due à une différence dans la dynamique d'expansion clonale des cellules infectées entre les différents sites anatomiques (McManus et al., 2019; Miller et al., 2019). Elle pourrait également être influencée par la présence de lymphocytes T mémoires dits « résidents des tissus » (T_{RM}) : ces lymphocytes maintiennent l'expression de CD69, qui favoriserait leur rétention dans les tissus plutôt que dans la circulation sanguine, et présentent un profil transcriptionnel différent des T mémoires CD69- retrouvés dans le même organe (Kumar et al., 2017). De plus, il a été démontré que ces T_{RM} peuvent être des cellules réservoirs du VIH (Cantero-Perez et al., 2019), bien que les études démontrant formellement le rôle de T_{RM} comme réservoir à long terme restent peu nombreuses. Certaines études tendent à montrer une compartimentalisation des populations virales dans les réservoirs au niveau du foie (Blackard et al., 2011), du système nerveux central (Brese et al., 2018; Gianella et al., 2016) et des testicules (Miller et al., 2019), alors que d'autres n'ont constaté aucune compartimentalisation au sein du système digestif (Imamichi et al., 2011) ou des ganglions lymphatiques (Lorenzo-Redondo et al., 2016; Wu et al., 2020). Plus récemment, l'analyse de la susceptibilité aux anticorps neutralisants, extrapolée à partir des séquences sous-génomiques d'*env* issus de 33 sites anatomiques, a suggéré que le système nerveux central serait le seul organe dans lequel la compartimentalisation provirale existerait (Wang et al., 2022).

1.4.2.3. Importance des autopsies

Comme nous venons de le voir, quelques études seulement ont comparé les réservoirs des lymphocytes T CD4+ en circulation avec des biopsies ou des ponctions issues d'un seul organe. Néanmoins, peu d'études ont comparé les réservoirs du VIH entre plusieurs compartiments anatomiques, puisque le prélèvement d'une grande quantité de cellules provenant de divers tissus humains n'est réalisable qu'après le décès. Cette limite pourrait éventuellement être surmontée grâce au développement de nouvelles techniques d'imagerie non-invasive, tel l'immunoPET (Beckford-Vera et al., 2022). Toutefois, les prélèvements *post mortem* constituent l'approche de choix pour étudier les populations virales persistant dans une variété d'organes.

Les autopsies ont initialement été pratiquées sur les PVVIH afin d'évaluer s'il y avait présence ou non de particules infectieuses dans les différents organes (Nyberg et al., 1990). Elles ont ensuite servi à la quantification d'ADN viral (Lamers et al., 2016) et à l'analyse de séquences sous-génomiques des provirus qui persistent dans les tissus pendant les ART (Nolan et al., 2018; Rose et al., 2016). Ces études ont ainsi révélé que de l'ADN, et parfois même de l'ARN de VIH, était présent dans l'aorte, les poumons, le cerveau, les testicules, les ganglions lymphatiques, la rate, le foie, les reins et le colon, et qu'on trouve des séquences d'*env* et de *nef* identiques entre différents organes. Afin de mieux caractériser une multitude de réservoirs anatomiques, des chercheurs de l'Université de Californie à San Diego (É.-U.) ont créé l'étude de fin de vie « The Last Gift » (Gianella et al., 2017), une cohorte de PVVIH qui acceptent de donner leurs corps à la science au moment de leur mort, permettant une autopsie rapide (Research). Cette précieuse bio-banque a déjà fourni ses premiers résultats. À l'aide de séquençage sous-génomique d'*env* sur des échantillons de 28 tissus prélevés *post mortem* chez quatre PVVIH sous ART, Chaillon *et coll.* ont révélé que le VIH persiste dans de multiples organes, à une fréquence allant de 0 à 659 copies d'ADN total par million de cellules. Ils ont aussi établi que plusieurs compartiments anatomiques (dont le tractus digestif et les ganglions lymphatiques) sont responsables de la dissémination virale ailleurs dans l'organisme, bien que le sang reste la source principale (Chaillon et al., 2020). Cette même équipe a également montré que les cellules infectées présentes dans les tissus profonds, chez un même individu, ont une susceptibilité similaire face aux bNAbs spécifiques au VIH, avec l'exception du système nerveux central (Wang et al., 2022). Cependant,

The Last Gift met surtout en évidence que d'autres études similaires sont nécessaires pour mieux comprendre les réservoirs tissulaires afin de développer des stratégies curatives, ou des traitements de longue durée.

1.4.3. Mécanisme de persistance

1.4.3.1. Homéostasie

Une fois les ART débutés, le réservoir de cellules infectées atteint un plateau qui restera très stable dans le temps (Besson et al., 2014; von Stockenstrom et al., 2015), ayant une demi-vie estimée à 44 mois (Bruner et al., 2019; Crooks et al., 2015; Peluso et al., 2020; Siliciano et al., 2003). Cette persistance s'explique d'abord par le type de cellules que cible le VIH. Le réservoir est principalement composé de lymphocytes T CD4+ mémoires (T_M) (Brenchley et al., 2004; Buzon, Sun, et al., 2014; Chomont et al., 2009; Duette et al., 2022; Hiener et al., 2017; Jaafoura et al., 2014; Josefsson et al., 2013; Pierson et al., 2000). Les T_M sont des cellules T CD4+ dérivées de cellules naïves ayant déjà été exposées à l'antigène dont elles sont spécifiques. Lors de l'activation d'une cellule naïve, celle-ci acquiert des fonctions effectrices propres en fonction de l'antigène reconnu et de l'environnement cytokinique. On les distingue ainsi (Owen et al., 2013; Chapitre 11 - T-Cell Activation, Differentiation, and Memory):

- Les Th1 sont responsables de l'immunité cellulaire envers des pathogènes intracellulaires;
- Les Th2 sont quant à eux en charge des réponses allergiques et de l'immunité envers des pathogènes extracellulaires;
- Les Th17 sont impliqués dans l'inflammation et le maintien de l'intégrité des muqueuses;
- Les T_{FH} (« T follicular helper ») se spécialisent dans l'activation des cellules B au niveau des centres germinatifs;
- Les T_{reg} (T régulateurs) agissent comme agents de régulation de l'activation immunitaire et de l'inflammation.

Suite à leur activation, ces cellules effectrices se multiplient en très grande quantité, un procédé nommé expansion clonale. Une fois le pathogène contrôlé, la réponse immunitaire se contracte pour éliminer au moins 90 % des lymphocytes T CD4+ effecteurs (Owen et al., 2013; Chapitre 11

- T-Cell Activation, Differentiation, and Memory). Cependant, une petite portion de ces cellules effectrices persiste sous la forme de cellules T mémoires (T_M). Les T_M sont des cellules au repos (dites quiescentes) responsables de la mémoire immunologique, et ont une demi-vie estimée de 8 à 15 ans (Murphy, 2017; Chapitre 11 - Integrated Dynamics of Innate and Adaptive Immunity). La prolifération homéostatique des T_M , c'est-à-dire le maintien à l'équilibre de la population cellulaire, est sous la responsabilité de l'interleukine 7 (IL-7) (Owen et al., 2013; Chapitre 11 - T-Cell Activation, Differentiation, and Memory), une cytokine qui favorise la survie cellulaire en stimulant la synthèse de Bcl-2, une protéine anti-apoptotique, via l'activation de STAT5 (Murphy, 2017; Chapitre 11 - Integrated Dynamics of Innate and Adaptive Immunity). On retrouve principalement deux types de T_M : les T centraux mémoires (T_{CM}), des cellules peu différenciées et quiescentes, qui sont principalement localisées au niveau des organes lymphoïdes secondaires, et qui ont la capacité de recirculer; les cellules T effectrices mémoires (T_{EM}), qui réactivent plus rapidement leur fonction effectrice lors d'une nouvelle stimulation, et qui sont principalement localisées dans les tissus effecteurs (Owen et al., 2013; Chapitre 11 - T-Cell Activation, Differentiation, and Memory).

Grâce à leur capacité de survie et de prolifération (Buzon, Sun, et al., 2014; Chomont et al., 2009; Jaafoura et al., 2014; Maldarelli et al., 2014; Riou et al., 2007; Wagner et al., 2014), les T_M infectés et latents formant le réservoir sont maintenus pendant des années. Étonnement, la prolifération homéostatique induite par l'IL-7 n'entraîne pas nécessairement de réaction virale (Bosque et al., 2011; Vandergeeten et al., 2013; Z. Wang et al., 2018), mais contribue plutôt au maintien de ces cellules par prolifération à bas bruit. De plus, ces cellules mémoires infectées tendent à exprimer des niveaux plus élevés de Bcl-2, ce qui les rend résistantes à l'élimination par les T CD8+ cytotoxiques (Ren et al., 2020). En somme, ces mécanismes permettent le maintien prolongé des cellules infectées sans qu'elles puissent être éliminées par le système immunitaire.

1.4.3.2. Expansion clonale

Les T_M constituent un type cellulaire prompt à proliférer s'il rencontre à nouveau leur antigène spécifique, et il est maintenant bien établi que l'expansion clonale des cellules infectées latentes joue un rôle primordial dans la persistance du réservoir (Cho et al., 2022; Coffin et al., 2019; Cohn et al., 2018; Cohn et al., 2015; Cole et al., 2022; Gantner et al., 2020; Kuo et al., 2020;

Maldarelli et al., 2014; Pinzone et al., 2019; Sannier et al., 2021; Simonetti et al., 2021; von Stockenstrom et al., 2015; Wagner et al., 2014). Tout comme pour la prolifération homéostatique, l'expansion clonale n'induit pas nécessairement la réactivation des provirus latents (Hosmane et al., 2017; Musick et al., 2019), et favorise ainsi le maintien du réservoir (Figure 17.).

Dû à de successives expansions clonales, et des phases de contraction qui les accompagnent, le réservoir est dynamique. Ce phénomène, dénommé le « wax and wane » (Z. Wang et al., 2018), fait en sorte que des clones de cellules infectées apparaissent et disparaissent au fil des années de ART. Ce phénomène a aussi pour effet qu'avec le temps, le réservoir tend à devenir de moins en moins diversifié (Cho et al., 2022). De plus, il a été estimé qu'à taille équivalente, les clones de cellules infectées sont plus stables dans le temps que les clones T CD4+ non infectés (Collora et al., 2022; Guo et al., 2022).

1.4.3.3. Virémie résiduelle et possibilité d'une réplication résiduelle

Les ART permettent de diminuer la charge virale plasmatique sous le seuil de la détectabilité. De nos jours, ce seuil est établi à <50 copies d'ARN viral par ml (Organization, 2022b). En revanche, des techniques de laboratoire hautement sensibles démontrent que la réplication n'est pas totalement abolie. On parle de réplication résiduelle, qui se déroule à bas bruit (Dornadula et al., 1999; Lewin et al., 1999; Zhang et al., 1999) (Figure 17.), et elle serait détectable chez la majorité des PVVIH sous ART depuis des années (Maldarelli et al., 2007; Palmer et al., 2008). Ce réservoir, considéré comme « actif », résulterait d'une mauvaise pénétration des ART dans différents compartiments anatomiques (Fletcher et al., 2014). Cette réplication résiduelle serait la probable cause des *blips* (sursauts), c'est-à-dire de courts épisodes de virémie intermittents durant les ART (Ramratnam et al., 2000). Cela dit, la virémie résiduelle ne semble pas induire d'évolution phylogénétique des populations virales (Gunthard et al., 2001), ce qui sous-entend plutôt une production de particules virales par des cellules infectées avant l'initiation des ART, plutôt qu'une production résultant de nouveaux cycles de réplication. Ce mécanisme ne serait donc que peu impliqué dans le maintien du réservoir, mais servirait plutôt d'élément prédictif de la durée avant un rebond de la charge virale lors d'interruption de traitement (TI) (J. Z. Li et al., 2016).

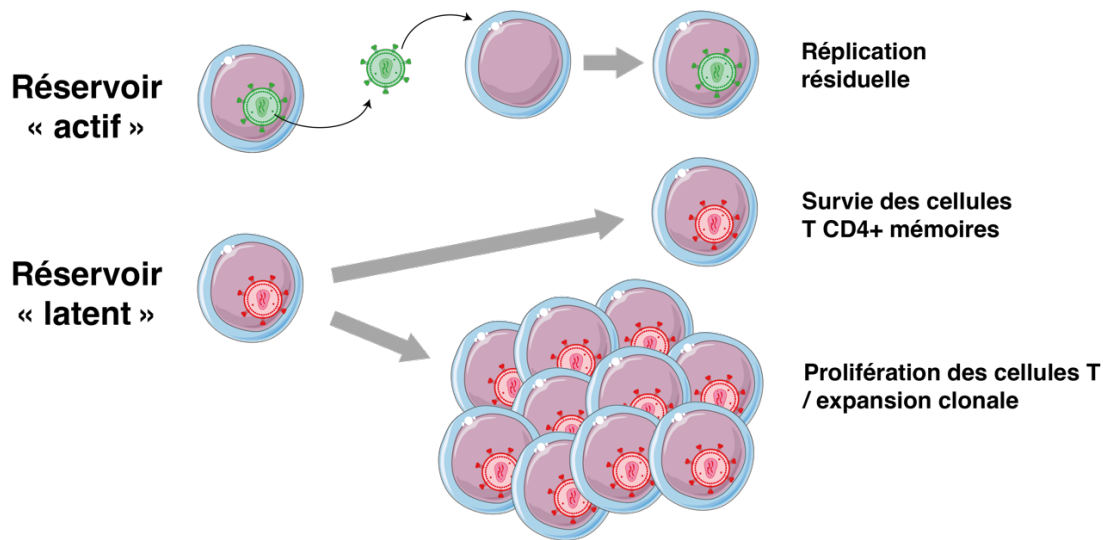


Figure 17. – Mécanismes proposés de la persistance des cellules infectées formant le réservoir

Trois mécanismes ont été proposés pour expliquer la persistance des réservoirs de cellules infectées. Le réservoir « actif » est constitué de quelques rares cellules infectées qui produisent de faibles quantités de nouveaux virions qui pourraient infecter de nouvelles cellules, malgré les ART. Le réservoir « latent » est constitué à la fois de cellules infectées mémoires qui se maintiennent pendant des années par homéostasie, et de cellules qui s’expandent suite à la stimulation TCR.

1.4.4. Caractérisation des réservoirs

On estime qu’il y a, en moyenne, 1,4 cellule portant un virus compétent pour la réplication par million de CD4+ mémoires chez les PVVIH qui sont sous ART (Chun, Carruth, et al., 1997), ce qui représente une fréquence très faible. Cependant, mesurer et caractériser les réservoirs viraux sont deux aspects essentiels pour guider le développement des stratégies de guérison et évaluer l’impact desdites stratégies sur ceux-ci.

Bien que le réservoir du VIH soit, par définition, constitué de provirus intacts, inductibles et compétents pour la réplication, il représente une minorité des génomes viraux qui persistent durant les ART chez les PVVIH. Différents éléments viraux (ARN, ADN, protéines, particules virales) peuvent être détectés et/ou quantifiés en laboratoire, chacun à l’aide de méthodes qui leur sont propres (Figure 18.). Il est donc important de déterminer, autant dans le contexte de recherches fondamentales que lors d’essais cliniques testant de nouvelles approches thérapeutiques, la

nature de la cible à mesurer. En effet, chaque cible requiert l'utilisation d'une méthode de détection spécifique, qui possède des avantages et des limites qui lui sont propres.

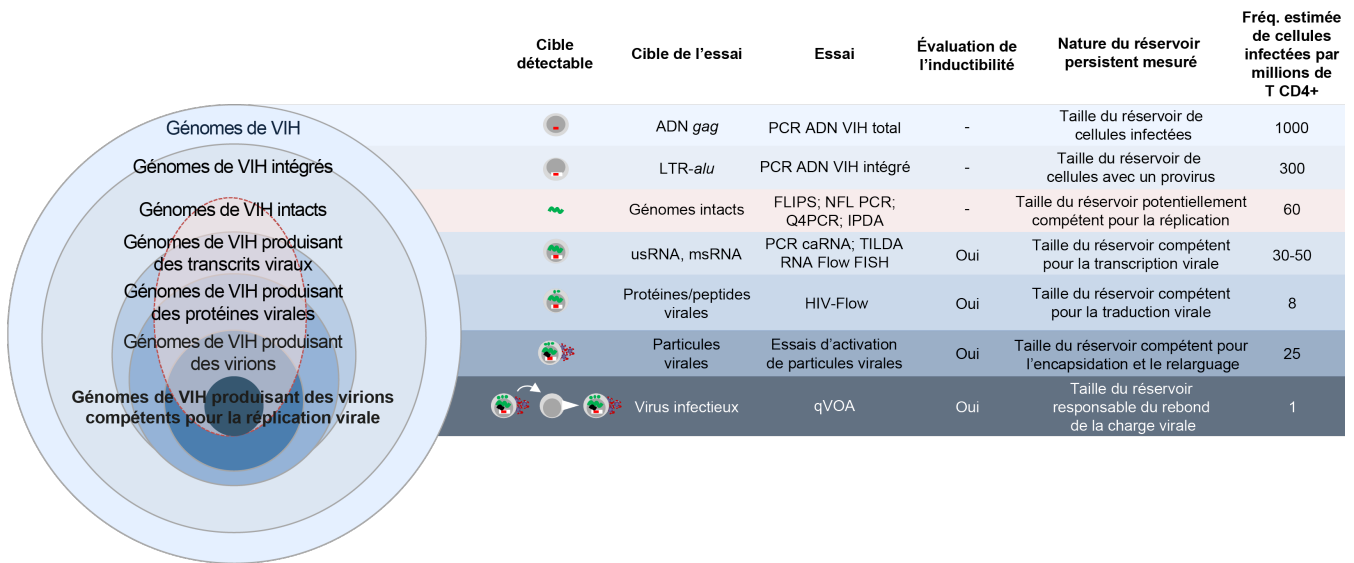


Figure 18. – Les différentes formes et mesures des réservoirs de cellules infectées qui persistent
Il existe une variété de mesure des réservoirs du VIH. Chaque méthode détecte une cible bien précise, et nous informe sur la taille des différentes formes de réservoirs. En général, plus l'essai est simple et rapide, plus la fréquence est élevée, et plus la fréquence est faible, plus la mesure représente le réservoir responsable du rebond de la charge virale (adaptée de Bruner et al., 2015). [usRNA = ARN viral non-épissé; msRNA = ARN viral complètement épissé; caRNA = ARN viral associé aux cellules; IPDA = « Intact Proviral DNA Assay »; TILDA = « Tat/rev induced limiting dilution assay »; qVOA « quantitative Viral Outgrowth Assay »]

1.4.4.1. Mesures quantitatives

Dans le cadre d'études sur la persistance du VIH, la première étape lors de la réception d'un échantillon biologique prélevé chez une PVVIH est la mesure de la taille des réservoirs persistants du VIH, soit la détermination de la fréquence de cellules infectées par le VIH par millions de cellules T CD4+. Bien qu'il existe une variété de protocoles d'analyses, ayant souvent des cibles différentes, l'objectif reste le même : établir la quantité de VIH, lorsque détectable, dans l'échantillon.

1.4.4.1.1 Quantification par PCR : ADN et ARN viraux

La méthode de mesure la plus sensible est la quantification des génomes du VIH. Elle se fait souvent à l'aide d'approches PCR (« polymerase chain reaction »), à partir d'un lysat cellulaire ou d'ADN extrait issu de CD4 ou de PBMCs (cellules mononuclées du sang périphérique, ou « peripheral blood mononuclear cells »), ce qui en fait une méthode de mesure simple et rapide. La mesure d'**ADN total de VIH**, déterminée par qPCR (« quantitative polymerase chain reaction ») (Christopherson et al., 2000; Gibellini et al., 2004) ou ddPCR (« digital droplet polymerase chain reaction ») (Strain et al., 2013), permet d'évaluer le nombre de génomes de VIH présents sous toutes ces formes. Ceci inclut l'ADN VIH intégré, mais également l'ADN non-intégré linéaire ainsi que les cercles 2-LTRs et 1-LTR. Ces méthodes reconnaissent une petite portion hautement conservée du génome du VIH, généralement dans *gag*, *pol* ou le LTR. Comme elle ne discrimine aucune des formes d'ADN viral, cette méthode donne la plus haute fréquence par million de cellules T CD4+. Afin de ne quantifier que les cellules ayant un provirus, il est possible de mesurer l'**ADN VIH intégré**, en utilisant une amorce située dans le génome viral (soit dans *gag*, soit dans le LTR) et l'autre qui s'apparie à une des nombreuses séquences répétées *Alu* retrouvées dans le génome humain, afin d'amplifier par PCR la jonction entre l'ADN viral et l'ADN cellulaire (Brussel & Sonigo, 2003). En combinant la mesure de ces deux cibles, il est possible de calculer le ratio ADN VIH intégré/ADN VIH total (Mexas et al., 2012). Chez les PVVIH sous ART prolongé, ces deux mesures quantitatives corrèlent entre elles et donnent un ratio s'approchant de 1, indiquant que la plupart des provirus qui persistent sont intégrés (Eriksson et al., 2013). Le principal défaut de la quantification d'ADN par PCR est qu'elle mesure une majorité de génomes viraux défectifs et donc, cette approche surévalue grandement le réel réservoir du VIH responsable du rebond de la charge virale. Néanmoins, la fréquence d'ADN VIH total est la méthode de mesure du réservoir la plus fréquemment utilisée, autant en laboratoires de recherche que diagnostique, principalement dû au fait qu'elle requiert peu de cellules, qu'elle n'est pas affectée par la congélation, qu'elle est peu coûteuse et très reproductible (Avettand-Fenoel et al., 2016). De plus, cette mesure est très informative sur le plan clinique puisqu'elle corrèle avec la progression vers le stade SIDA (Rouzioux et al., 2005), les risques de maladies neurodégénératives (Valcour et al., 2013), l'efficacité de la suppression de la charge virale lors de l'initiation des ART (Parisi et al., 2012) et

le niveau d'activation lymphocytaire (Cockerham et al., 2014), mais également avec le temps avant le rebond de la charge virale après TI (Assoumou et al., 2015; Piketty et al., 2010).

En utilisant des approches PCR, il est également possible de mesurer l'activité transcriptionnelle du VIH. Les ART interfèrent avec le cycle de réplication du VIH, mais elles n'ont pas d'effet sur le potentiel d'activation de la transcription virale à partir de génomes viraux déjà intégrés. De ce fait, certains provirus sont transcriptionnellement actifs durant les ART, et il est possible de mesurer cette initiation de la transcription par la quantité d'ARN viral de la région TAR détectable dans une cellule. En revanche, le processus de transcription virale peut être bloqué à différents stades, que ce soit au niveau de l'élongation, de la polyadénylation et/ou de l'épissage des ARN viraux (Yukl et al., 2018). Cette entrave à la transcription est une des cibles des agents de réversion de la latence (LRAs) utilisés dans les stratégies de « shock and kill ». En mesurant plusieurs formes de transcrits viraux, il est possible d'établir, et de quantifier, à quelle étape la transcription est interrompue. En effet, la présence de longs fragments de LTR indique que les ARN viraux sont élongués. La détection d'ARN viral polyadénylé est, quant à elle, indicatrice d'une transcription complète, puisque l'ajout de la queue poly-A à l'ARN correspond à la dernière étape de la transcription. Finalement, les transcrits Tat-Rev seront seulement détectables s'il y a eu épissage des ARN viraux (Yukl et al., 2018). De façon simplifiée, la quantification des ARN VIH associés aux cellules (**caRNA**) qui sont non-épissés (usRNA) ou complètement épissés (msRNA) permet d'évaluer l'activité transcriptionnelle du VIH (Kiselinova et al., 2014). Cette méthode nécessite l'extraction des ARNs produits par un groupe de cellules, d'où l'ARN viral sera rétro-transcrit en ADNc (ADN complémentaire). De là, des sondes spécifiques pour *gag* ou *pol* (usRNA), ou pour la jonction du produit d'épissage *tat/rev* (msRNA), permettront la détection et la quantification par qPCR (Pasternak et al., 2008) ou ddPCR (Massanella et al., 2015), ou encore dans un format de dilution limite comme le TILDA (« *Tat/rev* Induced Limiting Dilution Assay », décrit au point 1.4.4.1.4.) (Procopio et al., 2015), qui permet de mesurer une fréquence de cellules dans lesquels ces transcrits sont produits. La quantification des caRNA mesure les cellules infectées produisant des transcrits viraux, que ce soit à partir de provirus intacts ou défectifs (Plantin et al., 2018) et ne reflète toutefois pas nécessairement le réservoir à la source d'un rebond viral après TI. Malgré tout, cette mesure est prédictive du délai avant le rebond de la charge virale lors de TI (J. Z. Li et

al., 2016). Le ratio caRNA/ADN VIH permet aussi d'estimer la proportion du réservoir persistant qui est transcriptionnellement actif.

1.4.4.1.2. Quantification par culture cellulaire : qVOA

La méthode de référence pour la quantification du réservoir latent intact et compétent pour la réplication est le **qVOA** (« quantitative Viral Outgrowth Assay ») (Chun, Carruth, et al., 1997). Cette approche nécessite plusieurs millions (entre 2,5 et 90, selon les méthodes) (revu dans Massanella & Richman, 2016) de lymphocytes T CD4+ qui sont mis en culture, en dilution sérielle, en présence de cellules de donneurs non infectés, dénommées « feeder cells », pour être ensuite activés *in vitro*. L'étape de réactivation, dont la méthode varie selon les protocoles (phytohémmagglutinine (PHA); phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) et ionomycine (iono); anticorps anti-CD3/anti-CD28) (revu dans Massanella & Richman, 2016), induit la transcription virale dans les cellules infectées latentes. Les quelques virions qui sont produits pourront alors infecter les « feeder cells ». La culture de deux à trois semaines favorise ensuite l'amplification du signal, puisque chaque cellule infectée pourra produire elle aussi des virions qui infecteront d'autres « feeder cells ». À la fin des 21 jours, la concentration de la protéine de capsid virale (p24) présent dans le surnageant est mesuré par ELISA. En se basant sur la loi de Poisson, les dilutions en série permettent d'estimer la fréquence de cellules infectées qui ont produit des virions infectieux, représenté en IUPMs (« infectious unit per million CD4+ T cells ») (Rosenbloom et al., 2015).

Chez les PVVIH sous ART, la fréquence de cellules portant des virus compétents pour la réplication est d'environ 1 par million, soit 300 fois moins que la mesure d'ADN viral intégré, bien que ces deux mesures soient corrélées (Chun, Carruth, et al., 1997; Eriksson et al., 2013). Le qVOA reste une méthode de quantification laborieuse, qui nécessite une très grande quantité de cellules, un accès à une zone de confinement de niveau 3 pour effectuer la culture cellulaire, et dont les résultats dépendent de la méthode d'activation et du choix des « feeder cells » (Enick et al., 2021; Stone et al., 2021). De plus, cette approche est limitée par le fait qu'un seul cycle de stimulation n'est pas suffisant pour induire la réactivation de tous les provirus intacts et compétents pour la réplication (Ho et al., 2013). Les mesures de qVOA ont donc tendance à sous-estimer la taille réelle du réservoir VIH. Malgré ces limites, le qVOA demeure à ce jour une des méthodes les plus

utilisées pour estimer la fréquence des cellules infectées avec un provirus intact, inductible et compétent pour la réplication (Eriksson et al., 2013), et ainsi évaluer si la taille du réservoir a diminué dans le temps ou à la suite d'une intervention thérapeutique.

1.4.4.1.3. Quantifier l'intégrité du génome viral : séquençage et approches PCR

Les approches PCR étant nettement moins coûteuses et exigeantes que la culture cellulaire, de plus en plus de groupes de recherche tentent d'utiliser des méthodes de séquençage pour estimer la fréquence de virus intacts, dits potentiellement compétents pour la réplication. Cependant, séquencer le génome complet du VIH a longtemps été une tâche ardue. Une PCR conventionnelle s'effectue en général sur 1 ng (nanogramme) à 1 µg (microgramme) d'ADN, l'équivalent de 10^2 à 10^5 cellules humaines (Baumer et al., 2018), alors que la fréquence de virus intacts se situe quelque part entre 1 et 300 par 10^6 de cellules. Autre obstacle, la taille d'amplification standard des enzymes de PCR et de séquençage de type Sanger est d'environ 500 pb, alors que le VIH possède un génome de plus de 9000 pb. Finalement, la séquence du VIH est hautement variable, et flanquée de deux portions non-codantes identiques et orientées dans la même direction (LTR), rendant ardue l'élaboration d'amorces de PCR couvrant l'ensemble du génome. En effet, l'utilisation d'amorces qui s'apparieraient aux tout premiers nucléotides de la séquence du VIH en 5' (amorce sens) et aux tout derniers en 3' (amorce antisens) ferait en sorte que seulement le fragment de ~634 nucléotides correspondant à chaque LTRs serait amplifié. Pour toutes ces raisons, les approches de **séquençage sous-génomique**, qui n'amplifient qu'un gène ou même qu'une portion de celui-ci, ont longtemps été utilisées.

Les plateformes de séquençage de nouvelles générations, comme Illumina Mi-Seq et PacBio, ont ouvert la porte au séquençage de longs fragments avec un faible taux d'erreurs. Combiné au développement d'enzymes polymérase plus fidèles, mais surtout plus processives permettant d'amplifier des fragments de plusieurs milliers de nucléotides, les approches de séquençage du VIH se sont multipliées dans la dernière décennie. En 2013, l'équipe de Robert F. Siliciano a réussi à contrecarrer plusieurs de ces limites en utilisant une amplification nichée (« nested PCR »). Cette méthode de PCR se fait en deux étapes. D'abord, à l'aide d'amorces dites externes, la séquence-cible est préamplifiée en un seul fragment. Ensuite, une partie de cette amplification sert de matériel génétique de départ pour une seconde PCR, utilisant cette fois-ci des amorces internes

afin d'augmenter la spécificité et l'ampleur du signal. En utilisant cette approche, cette équipe a effectué une amplification interne du génome viral du VIH en 4 fragments de 4 450 à 6 400 pb. Chaque fragment se chevauche entre eux, ce qui permet ainsi d'obtenir une séquence quasi-complète (**NFL**, « near full-length ») après reconstruction *in silico* (Ho et al., 2013).

Depuis, différentes stratégies de séquençage NFL ont été élaborées, informant non seulement sur l'intégrité des réservoirs, mais également sur la séquence nucléotidique de ceux-ci (Bruner et al., 2016; Cho et al., 2022; Cole et al., 2022; Duette et al., 2022; Einkauf et al., 2022; Gantner et al., 2023; Hiener et al., 2017; Lee et al., 2017; Lian et al., 2021; Pinzone et al., 2019; Sannier et al., 2021). Le séquençage NFL comporte les mêmes avantages et inconvénients que les autres approches par PCR. En revanche, il requiert une étape de dilution limite afin d'obtenir une seule copie d'ADN viral par puits, selon la loi de Poisson où moins de 33 % des puits PCR doivent être positifs afin de s'assurer que dans 95% des cas, un seul génome soit présent dans le puits. De plus, cette approche expérimentale est onéreuse et nécessite l'accès aux plateformes de séquençage de nouvelles générations. Aussi, puisque le ratio « quantité de séquences par échantillon de PBMCs pouvant être analysée » sur « temps et efforts requis pour effectuer la méthode expérimentale » étant plutôt petit, l'utilisation à grande échelle des approches de séquençage est limitée. Finalement, l'amplification de longs fragments est connue pour être plus ardue et moins efficace que l'amplification de petits fragments, ce qui pourrait favoriser la détection des génomes de VIH défectifs présentant de grandes délétions au détriment des séquences intactes de 9 kb (kilopaire de bases) (White et al., 2022).

Puisque l'étape la plus dispendieuse de cette approche est celle du séquençage, des équipes ont développé des approches de quantification de l'intégrité du réservoir exclusivement axées sur l'amplification par PCR, soit pour éviter l'étape de séquençage (IPDA), soit pour augmenter la probabilité de ne séquencer que des génomes intacts (Q4PCR). Le **IPDA** (« Intact Proviral DNA Assay ») (Bruner et al., 2019) cible deux régions hautement conservées et essentielles à l'intégrité du VIH. Cette procédure détermine, par ddPCR, la proportion de provirus défectifs (une seule des deux cibles détectées) et de provirus intacts (deux cibles détectées) d'un échantillon de cellules. Ces deux régions, situées respectivement au niveau du locus Ψ et dans le RRE au sein du gène *env*, permettraient d'identifier plus de 90 % des génomes viraux défectifs (Bruner et al., 2019),

puisque ceux-ci sont souvent largement délétés ou hypermutés. En procédant à la quantification en parallèle d'un gène cellulaire, il est alors possible d'établir la fréquence (par million de T CD4+) de cellules infectées portant un provirus intact, et celles avec un génome VIH défectif. Le principal avantage du IPDA est d'être une technique de laboratoire plutôt simple et à haut débit, facilement utilisable à grande échelle dans le cadre d'études cliniques. Elle coûte également moins cher, et ne nécessite pas d'étapes de dilution limite. L'autre méthode axée sur une évaluation de l'intégrité par PCR est le **Q4PCR** (Gaebler et al., 2019). Cette méthode est basée sur la PCR nichée de VIH, à partir d'une dilution limite d'ADN extrait de T CD4+ purifiés, mais utilise ensuite la détection multiplexe de 4 cibles différentes par qPCR en temps réel afin d'enrichir en séquences de VIH potentiellement intacts avant le séquençage. Ces cibles sont situées dans le locus Ψ , dans *gag*, dans *pol* et dans la portion d'*env* qui englobe le RRE, et tolèrent jusqu'à 3 mésappariements nucléotidiques. Les amplicons détectables pour au moins 2 des 4 cibles sont alors amplifiés en NFL à l'aide d'amorces internes, puis séquencés. Par cette sélection, on obtient un enrichissement de la fréquence d'intacts, passant de 12,9 % sans sélection, à 26 % parmi les puits positifs pour 3 des cibles (2X plus), à 38 % parmi les puits doubles-positifs $\Psi+env$ (3X plus), et à 51 % parmi les séquences ayant été détectées par les 4 cibles (4X plus).

Une limite importante de ces deux techniques, comme pour toute approche de PCR, réside dans le fait que la diversité des génomes viraux peut altérer l'efficacité de l'amplification et la quantification des réservoirs de VIH (Cicilionyte et al., 2021). Ceci est particulièrement marqué pour un échantillon provenant d'une personne infectée avec un VIH de clade non B. Le taux d'erreur (« faux négatif ») de détection par IPDA correspond à la proportion de génomes viraux présentant un polymorphisme au niveau des deux régions ciblées par l'essai, empêchant la reconnaissance par les amorces ou les sondes. Initialement estimé à 6,3 % (Simonetti et al., 2020), ce taux d'erreur varie grandement selon les études, allant de 0 % (Bruner et al., 2019; Peluso et al., 2020) à 28 % (Kinloch et al., 2021). Ce problème est cependant facilement identifiable, puisqu'il résulte en 100 % de signal négatif. Il est donc possible de modifier les amorces et les sondes de cette méthode en fonction du polymorphisme, afin qu'elles correspondent à la séquence d'intérêt. En revanche, un polymorphisme qui ne serait présent qu'au sein d'une des deux régions de certains provirus d'une PVVIH sera impossible à déceler, entraînant

l'identification de séquences virales intactes comme étant défectives (Gaebler et al., 2021). La Q4PCR possède, pour sa part, les mêmes limites que le séquençage NFL.

Bien qu'elle soit plus simple et rapide que d'autres méthodes, la mesure d'intégrité par PCR n'est pas parfaite. D'une part, la proportion de faux positif par IPDA surestime la fréquence de provirus intacts; d'autre part, la difficulté à amplifier de longs fragments par NFL ou Q4PCR la sous-estimera. Toutes ces méthodes de quantification du réservoir intact, autant par séquençage que par PCR, ont permis d'estimer que 90 à 98 % des provirus qui persistent dans la circulation sanguine sont défectifs (revue dans (Kuniholm et al., 2022)). Il a également été démontré que le réservoir de provirus intact a une demi-vie nettement plus petite (~4,9 ans) que le réservoir défectif (estimée à 50 ans) une fois les ART initiés, et qu'il est surtout maintenu par expansion clonale (Cho et al., 2022). Cependant, parmi toutes ces études, l'inductibilité des provirus latents intacts n'a que rarement été évaluée (revu dans Cicilionyte et al., 2021).

1.4.4.1.4. Quantifier l'inductibilité du réservoir : approches PCR et cytométrie en flux

L'inductibilité d'un provirus correspond à sa capacité à sortir de son état de latence. L'évaluation du potentiel inductible d'une cellule infectée offre une information qualitative des réservoirs, en plus d'être quantifiable. D'une part, un provirus intact incapable de se réactiver (Einkauf et al., 2022) n'est pas impliqué dans le rebond de charge virale, tandis que des provirus défectifs compétents pour la transcription d'ARN viraux (Einkauf et al., 2022; Imamichi et al., 2016; Sannier et al., 2021) et/ou la traduction de protéines virales (Cole et al., 2022; Imamichi et al., 2020) sont fort probablement impliqués dans l'inflammation chronique observée chez les PVVIH (revu dans Kuniholm et al., 2022).

La première manifestation détectable de la réactivation d'un provirus est la production de transcrits viraux. Tel que vu dans la section 1.1.7., les ARN entièrement épissés (msRNA) sont essentiels pour la production de virions, puisque Tat et Rev sont indispensables pour les étapes d'élongation de la transcription et d'export nucléaire. Le concept de la méthode **TILDA** est donc de mesurer, grâce à la détection de la jonction *tat/rev* par qPCR en dilution limite, la proportion de T CD4+ qui produisent ces msRNA après réactivation par PMA/iono, ou spontanément en absence de stimulation *in vitro* (Procopio et al., 2015). La fréquence de cellules latentes

produisant des transcrits *tat/rev* après réactivation est d'environ 24 par million, et cette mesure corrèle avec les fréquences d'ADN VIH total et intégré.

La détection d'ARNm peut se faire autrement que par PCR. L'hybridation *in situ* d'échantillon tissulaire à l'aide de sondes nucléiques radiomarquées permet d'identifier les cellules dans lesquelles se trouve de l'ADN du VIH (DNAScope) ou l'ARN viral (RNAScope), sur des lames d'histologie, offrant une évaluation structurelle de la répartition des cellules infectées transcriptionnellement actives ou non (Deleage et al., 2016). La cytométrie en flux permet de déterminer s'il y a expression de protéines spécifiques sur ou dans chaque cellule d'un échantillon donné, en effectuant un marquage à l'aide d'anticorps couplés à différents fluorochromes. En adaptant la technique d'hybridation *in situ* d'ARNm (Porichis et al., 2014) pour le VIH, le **RNA Flow FISH** (Baxter et al., 2016; Grau-Exposito et al., 2017) offre la possibilité de mesurer la fréquence des cellules qui produisent des ARN viraux *gag-pol* après réactivation, tout en distinguant lesquelles produisent également de la capsid virale p24 (Baxter et al., 2016; Baxter et al., 2017). Cette méthode a permis d'établir que la fréquence de cellules portant un provirus inducible compétent pour la transcription (ARN+ p24-) chez les PVVIH sous ART est d'une médiane 97 cellules par million de cellules T CD4+ (Sannier et al., 2021), tandis que celle de provirus compétent pour la transcription et la traduction (ARN+ p24+) est d'une médiane de 3,6 cellules par million de cellules T CD4+ (Baxter et al., 2016).

La fréquence des cellules infectées capables de produire la protéine p24 après réactivation peut également être mesurée par **HIV-Flow** (Pardons, Baxter, et al., 2019), une autre technique de détection par cytométrie en flux. Ce procédé utilise une double détection, grâce à l'utilisation d'anticorps reconnaissant deux épitopes différentes de la protéine de capsid virale. Cette double positivité élimine la grande majorité du bruit de fond, c'est-à-dire un marquage non-spécifique présent dans le signal de chaque anticorps anti-p24 individuellement. Chez les PVVIH sous ART, le HIV-Flow permet de mesurer la fréquence moyenne de cellules infectées avec un virus inducible et compétent pour la traduction (4,3 par millions de cellules T CD4+). Cette fréquence corrèle avec d'autres marqueurs de réservoir inducible, soit la fréquence de cellules infectées avec un provirus inducible et compétent pour la transcription (mesurée par TILDA) et la fréquence de cellules infectées avec un provirus inducible et compétent pour la réplication

(mesurée par qVOA) (Pardons, Baxter, et al., 2019). Comparativement au RNA Flow FISH, le HIV-Flow a l'avantage d'être plus simple à effectuer, de nécessiter nettement moins de cellules (50 millions de PBMCs initialement VS 100-200 pour le RNA Flow FISH (Baxter et al., 2017)) et d'être peu affecté par la présence de polymorphisme entre les individus, et entre les clades, puisqu'il détecte une cible protéique. Il ne fournit néanmoins aucune information transcriptionnelle. Tout comme pour le qVOA, ces deux approches par cytométrie en flux nécessitent une étape de réactivation du réservoir, qui n'est pas suffisante pour induire l'activation de tous les provirus (Ho et al., 2013).

1.4.4.2. Mesures qualitatives : caractérisation phénotypique des cellules réservoirs

Les mesures quantitatives ont l'avantage d'être simples et rapides à effectuer. Bien qu'elles apportent de précieuses informations sur la quantité de VIH présents dans un échantillon, sous différentes formes, elles n'offrent que peu de renseignements sur la nature des cellules infectées qui composent ces réservoirs. C'est pourquoi les mesures qualitatives sont indispensables pour guider les efforts de développement de stratégies d'éradication du VIH.

Les premières données qualitatives sur les réservoirs de VIH persistant durant les ART proviennent de mesures quantitatives, tels les PCR d'ADN VIH ou le qVOA, qui ont été effectués sur des populations cellulaires spécifiques, préalablement enrichies ou triées en fonction d'un phénotype précis. En comparant les mesures de réservoir de ces populations avec celles de la population générale de cellules T CD4+, diverses équipes ont démontré que le VIH persiste principalement au sein des cellules T CD4+ mémoires (Brenchley et al., 2004; Buzon, Sun, et al., 2014; Chomont et al., 2009; Jaafoura et al., 2014; Josefsson et al., 2013; Pierson et al., 2000). Plus précisément, on retrouve les cellules infectées essentiellement au sein des sous-types centrales (T_{CM} : CD4+ CD45RA- CCR7+ CD27+) et transitionnelles (T_{TM} : CD4+ CD45RA- CCR7- CD27+; (Chomont et al., 2009), ayant des fonctions effectrices responsables de la réponse contre les pathogènes intracellulaires (Th1 : CD4+ CD45RA- CXCR3+) (Banga et al., 2018), de l'immunité mucoale de l'intestin (Omenetti et al., 2019) (Th17 : CD4+ CCR6+ CCR4+; (Gosselin et al., 2017) ou de la maturation des lymphocytes B au sein des centres germinatifs des ganglions lymphatiques (Breitfeld et al., 2000; Schaerli et al., 2000) (T_{FH} : CD4+ CD45RA- CXCR5hi PD-1hi; (Banga et al., 2016), et exprimant plus couramment les molécules de points de contrôle

immunitaire PD-1, TIGIT, LAG-3 et CTLA-4 («cytotoxic T-lymphocyte antigen 4»), en combinaison ou non (Banga et al., 2016; Chew et al., 2016; Chomont et al., 2009; Fromentin et al., 2016; McGary et al., 2017; Perreau et al., 2013).

D'autres marqueurs d'enrichissements (Tableau 1.), exprimés préférentiellement par les cellules du réservoir chez les PVVIH sous ART, ont aussi été rapportés, incluant le marqueur d'activation HLA-DR (Horsburgh et al., 2020; Pardons, Baxter, et al., 2019); les molécules de costimulation CD2 (Iglesias-Ussel et al., 2013) et CD161, principalement sur les précurseurs de Th17 (X. Li et al., 2019); l'intégrine VLA-4 (Pardons, Baxter, et al., 2019), une molécule d'adhésion qui favorise la migration des cellules immunitaires vers les tissus inflammés; et même la molécule CD20 (Serra-Peinado et al., 2019), généralement associée aux lymphocytes B, mais qui est aussi indicative d'une petite population (~1,6 % des CD3+) de lymphocytes T fortement activés et prompts à l'apoptose (Wilk et al., 2009). Finalement, deux molécules de surface, le récepteur de TNF CD30 (Hogan et al., 2018) et le récepteur Fc- γ CD32a (Darcis et al., 2020; Descours et al., 2017) initialement suggérés comme marqueur du réservoir, sont considérés comme des marqueurs de la réplication active.

Les méthodes d'analyse de l'intégrité virale ont également été appliquées sur des populations présélectionnées, et ont permis de montrer que les provirus intacts sont enrichis au sein des T_{EM} (CD4+ CD45RO+ CCR7- CD27-) (Duette et al., 2022; Hiener et al., 2017), des Th1 (CD4+ CD45RO+ IFN- γ +) (Lee et al., 2017), des Th2 (CD4+ CD45RA- CXCR3- CXCR5- CCR4+ CCR6-) (Kuo et al., 2020), des cellules activées (CD4+ CD45RA- HLA-DR+) (Horsburgh et al., 2020), des T_M exprimant le récepteur de lectine de type C CD161 (X. Li et al., 2019) ou encore avec de plus hauts niveaux d'expression de la molécule pro-survie Bcl-2 (Ren et al., 2020). Cependant, ce type d'approches, dans lesquelles un phénotype est d'abord sélectionné pour ensuite identifier la présence de VIH ou non parmi cette population, nécessite une grande quantité de cellules et offre un potentiel exploratoire limité: elles nécessitent de sélectionner préalablement des marqueurs phénotypiques qui pourraient enrichir en cellules infectées persistantes, et ne permettent pas d'identifier de nouveaux marqueurs du réservoir persistant pendant les ART. Pour surmonter cette limite, de nouvelles méthodes d'analyses qualitatives ont été développées dans les

dernières années afin d'identifier d'abord les cellules infectées, et ensuite d'identifier leurs caractéristiques comparativement aux nombreux lymphocytes T CD4+ non infectés.

| Molécule | Publication | Rôle/information phénotypique | Enrichissement de quelle forme du réservoir | Notes |
|--|---|--|---|--|
| CD45RA+ CD45RO- | Chomont et al. Nat Med 2009 Hiener et al. Cell reports 2017 Pardons et al. PLoS Pathog 2019 | T CD4+ mémoires et sous-types | ADN VIH ARN VIH Protéine virale | Les T _{CM} contribuent le plus au réservoir Les T _{TM} sont enrichis en ARN viraux Les T _{TM} et les T _{EM} sont enrichis en protéines virales |
| CCR7+/- CD27+/- | Gálvez et al. mBio 2021 Duette et al., J Clin Invest 2022 | | Provirus intact | Les T_{EM} sont enrichis en intacts |
| CXCR3+/- CCR4+/- CCR6+/- | Gosselin et al. AIDS 2017 Lee et al., J Clin Invest 2017 Kuo et al., J Infect Dis 2020 Collora et al. Immunity 2022 | T CD4+ effecteurs | ADN intégré VIH Provirus intact | Les Th17 et Th1/Th17 sont enrichis en ADN intégré Les Th1 et les Th2 sont enrichis en provirus intacts |
| CD2^{high} | Iglesias-Ussel et al., J Virol 2013 Galvez et al., mBio 2021 | Co-récepteur T et NK | ADN VIH intégré ARN VIH | Enrichissement parmi les T mémoires non activés |
| CD20+ | Serra-Peinado et al., Nat Commun 2019 Galvez et al., mBio 2021 | Différenciation des B principalement | ADN VIH ARN VIH | Enrichissement sur les T CD4+ non activés |
| CD30+ | Hogan et al., PLoS Pathog 2018 Wang et al., Blood Adv 2018 | Récepteur TNF | ARN VIH | Plutôt un marqueur de la réplication active |
| CD32a+ | Descours et al., Nature 2017 Darcis et al., Cell Rep 2020 | Récepteur FcγII | ADN VIH Compétent pour la réplication | Abdel-Mohsen et al., Sci Transl Med 2018 Pérez et al., Nature 2018 Bertagnoli et al., Nature 2018 Galvez et al., mBio 2021 Plutôt un marqueur de la réplication active |
| CD57- | Brenchley et al. J Virol 2004 | Marqueur des T mémoires terminalement différenciés | ADN VIH | Enrichissement parmi les T mémoires non terminalement différenciées |
| CD127+ | Hsiao et al., PLoS Pathog 2020 | Chaîne α du récepteur à l'IL-7 | ADN VIH intégré Marqueur associé à la latence | Enrichissement parmi les T mémoires |
| CD161+ | Li et al., mBio 2019 | Récepteur de lectine de type C | ADN VIH Provirus intact (IPDA) Compétent pour la réplication | Enrichissement parmi les T mémoires |
| PD-1+ (CD279) LAG-3+ (CD223) TIGIT+ CTLA-4+ (CD152) | Chomont et al. Nat Med 2009 Perreau et al., J Exp Med 2013 Chew et al. PLoS Pathog 2016 Fromentin et al. PLoS Pathog 2016 Banga et al. Nat Med 2016 McGary et al. Immunity 2017 Pardons et al. PLoS Pathog 2019 Sun et al. Nature 2023 | Molécule de point de contrôle immunitaire | ADN VIH Protéine virale (p24) Provirus intact Compétent pour la réplication | Enrichissement parmi les T mémoires: - PD-1 en ADN intégré - CTLA-4+PD-1+ en ADN total - PD-1+LAG-3+TIGIT+ en ADN intégré - PD-1+ ou TIGIT+ en protéine virale - PD-1+CXCR5+ (T _{FH}) en provirus compétent pour la réplication - PD-1+ ou TIGIT+ en provirus intacts |
| HLA-DR+ | Pardons et al., PLoS Pathog 2019 Horsburgh et al., AIDS 2020 | Marqueur d'activation | Protéine virale (p24) Provirus intact | Enrichissement parmi les T mémoires |
| α4β1+ (CD49d & CD29) | Pardons et al., PLoS Pathog 2019 | Intégrine VLA-4 | Protéine virale (p24) | Enrichissement parmi les T mémoires |
| BCL-2^{high} | Ren et al. J Clin Invest 2020 | Pro-survie | ADN VIH Protéine virale (p24) Provirus intact (IPDA) | Enrichissement parmi les T mémoires |

Tableau 1. – Les différents marqueurs d'enrichissement du réservoir qui persiste pendant les ART

Parmi les marqueurs d'enrichissement, certains ont particulièrement été associés aux provirus intacts.

1.4.4.2.1. Phénotyper les réservoirs compétents pour la traduction : HIV Flow

Lorsqu'une cellule infectée produit de nouvelles particules virales infectieuses, elle doit avoir préalablement synthétisé les quinze protéines encodées par le génome du VIH. En détectant

les cellules infectées qui expriment une de ces protéines virales, la p24, le HIV-Flow quantifie les provirus compétents pour la traduction, l'étape en amont de l'assemblage dans le cycle viral (Pardons, Baxter, et al., 2019) (Figure 19.). Cette méthode de détection peut quantifier soit le réservoir actif chez les PVVIH dites virémiques (c.-à-d. qui ne prennent pas de ART), soit le réservoir inductible (après stimulation *in vitro*) chez les PVVIH sous ART.

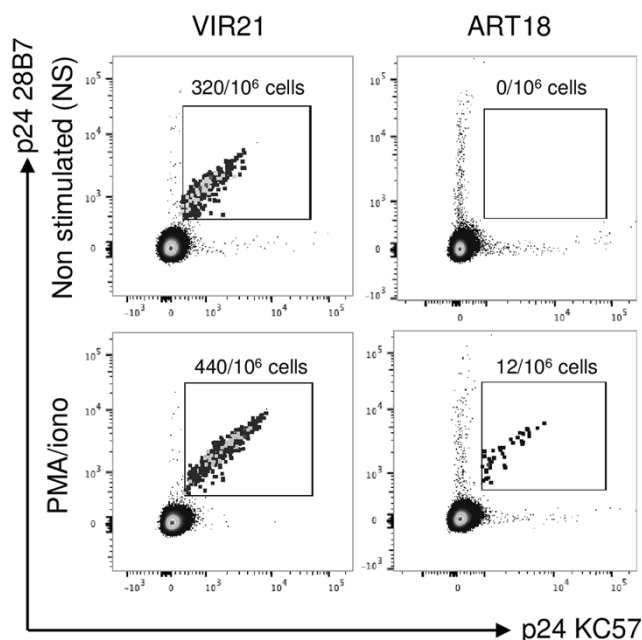


Figure 19. – Le HIV-Flow, une méthode de détection par cytométrie en flux des cellules infectées inductibles et compétentes pour la traduction de la capsid virale

Représentation de la détection spécifique des cellules exprimant de la capsid virale (p24) à leur surface, après stimulation ou non (figure 1b tirée de Pardons, Baxter, et al., 2019). [VIR = échantillon de personne vivant avec le VIH qui n'est pas sous ART; ART = échantillon de personne vivant le VIH qui est sous ART; NS = échantillon non-stimulé in vitro; PMA/iono = échantillon stimulé in vitro; p24 28B7 et p24 KC57 = les deux anticorps anti-p24 avec leur fluorochrome respectif]

Fait important, la cytométrie en flux est un outil de phénotypage, puisqu'elle permet d'identifier une pléthore de protéines exprimées à la surface ou au niveau du cytoplasme des cellules analysées, tout en mesurant leurs niveaux d'expression. En ce qui concerne le HIV-Flow plus

précisément, les lymphocytes T CD4⁺ enrichis, prélevés chez des PVVIH sous ART, sont d'abord stimulés durant 24 h à l'aide de PMA/iono, en présence de Brefeldin A (BFA) afin d'induire l'expression de protéines virales. Ensuite, les cellules sont incubées avec des anticorps de détection : ceux-ci sont couplés à différents fluorochromes et forment un panel de caractérisation extracellulaire. Finalement, ces cellules T CD4⁺ sont fixées et perméabilisées en prévision du marquage intracellulaire pour la détection de la p24 (Pardons, Baxter, et al., 2019). La BFA est utilisée dans le cadre du HIV-Flow pour contrecarrer l'augmentation de l'expression de plusieurs protéines, engendrée par la PMA/iono. C'est un composé pharmacologique d'origine fongique qui agit sur les tubules de l'appareil de Golgi, bloquant le transport entre celui-ci et le réticulum endoplasmique, ce qui a pour effet d'empêcher la sécrétion des protéines nouvellement synthétisées (Chardin & McCormick, 1999; Colanzi et al., 2013; Fujiwara et al., 1988). Bien qu'elle aide à préserver le phénotype des cellules ainsi stimulées, la BFA n'a pas d'impact sur les protéines dont l'expression sera diminuée à la suite de la stimulation, comme le récepteur CD4 par exemple (Pardons, Baxter, et al., 2019).

Dans l'étude de Pardons *et coll.*, trois panels de caractérisation, regroupant 12 marqueurs d'intérêt (CD3, CD4, CD45RA, CCR7, CD27, PD-1, LAG-3, TIGIT, Tim-3, $\alpha 4$, $\beta 1$, $\beta 7$), ont été utilisés sur des cellules T CD4⁺ de 12 PVVIH sous ART. L'analyse de ces marqueurs extracellulaires sur la population double positive pour la capsid virale (p24⁺), en comparaison à la population T CD4⁺ générale, a permis de révéler que les cellules infectées dont le provirus est inductible et compétent pour traduction expriment plus fréquemment (~2X plus) les molécules de points de contrôle immunitaires PD-1 et TIGIT, qu'elles sont significativement enrichies parmi les sous-types mémoires transitionnels (T_{TM}; 35,4 % des p24⁺) et effecteurs (T_{EM}; 35,7 % des p24⁺), et que ces cellules expriment presque toujours (74 % des p24⁺) l'intégrine $\alpha 4\beta 1$ à leur surface (Pardons, Baxter, et al., 2019).

1.4.4.2 Phénotyper les réservoirs compétents pour la transcription : RNA Flow Fish

Il est aussi possible d'utiliser la cytométrie en flux pour détecter les cellules infectées transcriptionnellement actives et les caractériser phénotypiquement. Le RNA Flow FISH, détaillé précédemment, est une méthode d'hybridation de l'ARN messager viral. Cette approche se base sur la détection de deux cibles en simultanées : l'ARN de *gag* et la protéine de la capsid virale

(p24) (Baxter et al., 2016). Le RNA Flow FISH a également été adapté pour permettre la distinction entre les différentes formes de transcrits. Pour ce faire, une sonde 5'exonRNA identifie en premier lieu toutes les cellules infectées transcriptionnellement activées par la stimulation. Ensuite, deux sondes, une pour *gag*RNA (transcrits d'ARNg) et une pour *nef*RNA (ARN pleinement élongués), permettent de discriminer entre les ARN viraux élongués non-épissés (usRNA: 5'exonRNA+ *gag*RNA+ *nef*RNA+) et ceux élongués épissés (msRNA: 5'exonRNA+ *gag*RNA- *nef*RNA+) (Sannier et al., 2021) (Figure 20.). Cette étude a démontré que différentes classes de LRAs, incluant les inhibiteurs d'HDAC (histone déacétylase) et les agonistes de PKC, n'ont pas le même profil de réactivation transcriptionnelle (Sannier et al., 2021), constat également observé entre l'HDAC romidepsine et le TNF- α (Martrus et al., 2016). De plus, les auteurs ont révélé que les T_{CM} tout autant que les T_{EM} infectées produisent des transcrits viraux après stimulation. Il est également à noter qu'en plus d'un niveau basal d'activation différent, les sous-types mémoires des lymphocytes T CD4+ ont une permissivité variable face aux différentes classes de LRAs, voire même face aux molécules d'une même classe (exemple : entre vorinostat et romidepsine, 2 HDACs) (Pardons, Fromentin, et al., 2019), mettant l'accent sur la nécessité d'utiliser plusieurs LRAs en combinaison pour réactiver les réservoirs de VIH. Néanmoins, les provirus compétents pour la traduction sont principalement retrouvés parmi les T_{EM} (Sannier et al., 2021), suggérant, tout comme avec le HIV-Flow, que l'environnement cellulaire faiblement activé des T_{CM} est défavorable à la production de protéines virales.

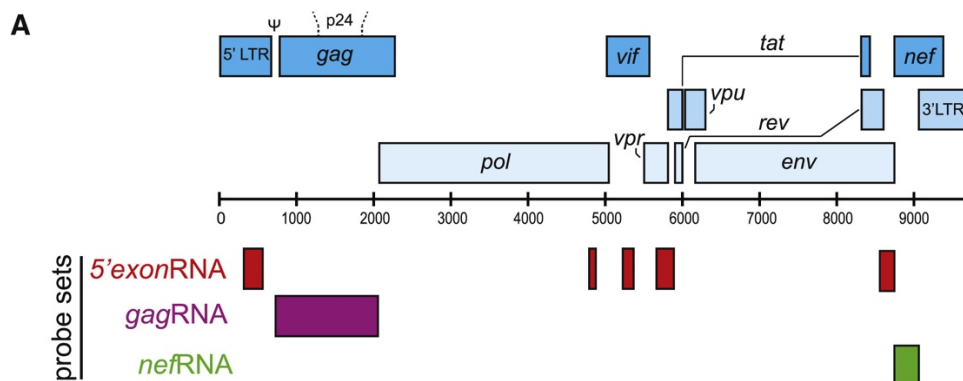


Figure 20. – Schéma représentant les sites de détection du RNA Flow FISH

Le RNA Flow FISH permet, à l'aide de sondes, de différencier différents types de transcrits viraux (figure 1a tirée de Sannier et al., 2021).

1.4.4.2.3. Phénotyper des cellules infectées qui persistent en fonction de leur transcriptome

La cytométrie est une technologie qui compte et caractérise les cellules d'un échantillon, mais elle est cependant limitée par le nombre de marqueurs pouvant être étudiés simultanément. Jusqu'en 2016, il fallait utiliser la cytométrie de masse pour analyser plus de 20 marqueurs dans un même panel. C'est d'ailleurs cette technologie, à l'aide d'un cytomètre CyTOF, qui a été utilisée dans la méthode PP-SLIDE pour déterminer, par prédiction, le phénotype des cellules infectées latentes avant stimulation à l'aide d'un panel de 39 marqueurs (Neidleman et al., 2020). L'arrivée du FACSymphony de BD, incorporant jusqu'à 9 lasers, a permis de faire de la cytométrie en flux avec des panels allant, en théorie, jusqu'à 50 fluorochromes (BD, 2016). Sony, ayant commercialisé le premier cytomètre spectral en 2012 (Scientific), dévoilait en 2019 son nouvel analyseur ID7000, promettant une détection possible jusqu'à 44 couleurs (Sony, 2019). Ces technologies, qui continueront inévitablement d'évoluer, permettront éventuellement de dévoiler un étendu plus complet des protéines exprimées par une seule cellule.

L'étude du transcriptome consiste en la détection et la quantification de tous les ARNm produits par les cellules composant un échantillon (Haque et al., 2017). Cette méthode d'analyse fut perfectionnée afin de rendre possible le séquençage des ARNm au niveau de la cellule individuelle (**scRNA-seq**) (Tang et al., 2009). Ceci permet d'identifier des profils transcriptionnels présents chez une minorité de cellules, qui sont préalablement isolées par dilution limite ou par tri à l'aide de la cytométrie en flux, ou encore par des méthodes microfluidiques ou de microdissection par capture laser (LCM) (Chen et al., 2019). Là où la cytométrie est actuellement limitée à une quarantaine marqueurs par cellules, le séquençage d'ARN peut, quant à lui, donner des informations concernant jusqu'à 10 000 gènes par cellule (Zaongo et al., 2022).

Le premier rapport de séquençage d'ARN en lien avec le VIH date de 2011 et s'est intéressé à la dynamique transcriptionnelle des cellules nouvellement infectées par le VIH. Les chercheurs ont démontré que le transcriptome d'une lignée cellulaire lymphocytaire, les SUP-T1, est constitué de 40 % de transcrits d'origine virale 24 h post-infection, et que l'expression de plus de la moitié des gènes cellulaires chez cette lignée T CD4+ est altérée (Chang et al., 2011). Cette approche de séquençage a également permis d'évaluer l'hétérogénéité des lymphocytes T CD4+ face à la

permissivité de l'infection, ou encore le potentiel de réactivation des cellules infectées. Il a ainsi été démontré que le marqueur d'activation CD25 favorise grandement l'infection, et d'autant plus lorsque la cellule activée exprime également CD298, CD63 et CD317/BST-2/Tetherin (Rato et al., 2017). À l'aide d'un modèle de latence de cellules primaires, l'analyse du transcriptome des cellules infectées réactivées par stimulation antigénique révèle une meilleure activité métabolique chez ces cellules, les prédisposant à répondre à la stimulation TCR, mais également à réactiver la transcription virale (Golumbeanu et al., 2018).

Le scRNA-seq est d'autant plus intéressant puisqu'il permet d'identifier les cellules infectées transcriptionnellement actives tout en déterminant leur transcriptome. Après stimulation par la PHA, la méthode **LURE** isole les cellules infectées exprimant des protéines d'enveloppe à leur surface, grâce à un cocktail d'anticorps neutralisant à larges spectres (bNAbs) biotinylés (Cohn et al., 2018). Ces cellules persistantes présentent une forte expression de deux marqueurs des cellules du réservoir, *TIGIT* et *HLA-DR*, et de différents répresseurs de l'expression des gènes viraux, dont *MiR-155*, *CCL3* et *PRDM1*, favorisant l'état de latence, tout en ayant une plus faible expression de gènes associés à la réponse interféron de type I (Cohn et al., 2018). L'approche **SortSeq** permet de caractériser les facteurs cellulaires, et non propres au VIH, qui sont favorables à la transcription virale après stimulation. De ce fait, les cellules T CD4⁺ de PVVIH sont stimulés durant 16 h avec la PMA/Iono, puis l'ARN du VIH est hybridé à l'aide de deux groupes de 96 sondes couplées à un fluorochrome reconnaissant soit la région 5', soit la région 3' des transcrits viraux. Les cellules doubles positives (HIV-1 SortSeq⁺) sont ensuite triées individuellement en prévision d'un scRNA-seq. Cette étude a montré que les cellules infectées latentes et transcriptionnellement activées par la stimulation sont enrichies en cellules exprimant les gènes codant pour l'IFN- γ et l'IL-2, un profil cytokinique propre au Th1. Les cellules SortSeq⁺ ont également une plus grande expression de *IMPDH1* et *JAK1*, associés à la transcription du VIH, de *IL2* et *IKBKB*, des molécules favorisant la survie cellulaire, ainsi que des régulateurs immunitaires *LTA*, *CCL3*, *CCL4* et *XCL1* (Liu, Yeh, et al., 2020). Aussi, les auteurs ont révélé, dans une lignée cellulaire (Jurkat) infectée *in vitro*, que le promoteur du VIH active la transcription du gène cellulaire en aval du site d'intégration, et que ceci engendre la synthèse d'ARNm viraux anormaux (Liu, Yeh, et al., 2020). L'équipe de Michel Nussenzweig s'est quant à elle intéressée plus

spécifiquement au **transcriptome de clones de provirus intacts** et latents qui persistent chez six PVVIH sous ART. Ces cellules, non stimulées, sont triées en fonction de la région variable de la chaîne β de leur récepteur T (*TRBV*), puis soumises à du scRNA-seq via la plateforme 10X Genomics. Leurs résultats montrent que ces clones sont retrouvés parmi des T_{EM} exprimant de forts niveaux d'*HLA-DR* (molécule de présentation antigénique), d'*HLA-DP* (protéine chaperonne d'*HLA-DR*), de *CD74* (chaîne invariable du CMH-II), mais également de gènes propres à l'inflammation et la cytotoxicité (*CCL5*, *GZMA* et *GZMK*), et de *CST7*, un gène associé à l'échappement de la réponse cytotoxique des cellules NK (« natural killer ») (Weymar et al., 2022). Tout dernièrement, la méthode **FIND-seq** a identifié, chez trois PVVIH sous ART, deux groupes de gènes permettant de distinguer les cellules infectées des cellules saines. Cette nouvelle approche de microfluidique permet de trier individuellement les cellules dans lesquelles l'ADN du VIH est présent, en prévision d'un scRNA-seq. Dans cette étude, l'équipe a décelé deux modules de gènes différemment exprimés chez les cellules infectées leur conférant un profil transcriptionnel favorisant la répression virale et la survie cellulaire (Clark et al., 2023).

Un gène transcrit ne signifie pas nécessairement qu'il sera exprimé sous forme de protéine. Bien que le scRNA-seq fournisse un grand nombre d'informations en simultané, il est important de confirmer les données de transcriptomique par une analyse protéomique. C'est ce que l'étude de Beliakova-Bethell *et coll.* a réalisé, à la suite de l'identification de douze gènes dont l'expression est augmentée suite à l'infection *in vitro* de cellules primaires lymphocytaires. Les chercheurs ont démontré que seulement deux de ces gènes, *CEACAM1* et *PLXNB2*, permettent effectivement d'enrichir en cellules infectées latentes, autant dans leur modèle de latence que parmi une population de cellules T CD4+ issues de PVVIH (Beliakova-Bethell et al., 2022). Somme toute, les différentes analyses du transcriptome des cellules infectées qui persistent durant les ART rendent possible l'étude exploratoire, et à haut débit, du phénotype du réservoir.

1.4.4.2.4. Évaluer la clonalité des réservoirs : séquençages du VIH (sous-génomique ou NFL), des sites d'intégration, des TCR

Il est désormais bien établi que les réservoirs de cellules infectées qui persistent durant des années de ART sont composés de plusieurs clones cellulaires. En effet, il est estimé que les

clones de cellules infectées, formés rapidement après l'infection (Gantner et al., 2023), sont détectables dans les quatre semaines PI (Coffin et al., 2019).

La première approche d'évaluation de la clonalité des réservoirs consiste à séquencer les sites d'intégrations des provirus, c'est-à-dire la zone de jonction entre l'ADN cellulaire et l'ADN viral (Boritz et al., 2016; Coffin et al., 2019; Cohn et al., 2015; Maldarelli et al., 2014; Wagner et al., 2014). Puisque l'intégration de l'ADN viral peut en théorie se produire n'importe où dans le génome cellulaire, les probabilités que deux virus distincts se soient intégrés précisément au même endroit au sein du génome humain de deux cellules distinctes sont pratiquement nulles (revu dans Liu, Simonetti, & Ho, 2020). La présence de sites d'intégration identiques dans deux cellules distinctes signifie donc l'existence de la prolifération des cellules réservoirs (et donc de leur clonalité), puisque la mitose engendrera deux cellules filles possédant le même site d'intégration du VIH. Cet outil d'évaluation de la clonalité permet de comparer la localisation et l'orientation des provirus présents parmi des expansions de lymphocytes T à ceux des cellules infectées non clonales. Ceci permet d'étudier l'impact d'un site d'intégration sur l'expansion et la persistance des réservoirs au fil du temps. L'analyse des sites d'intégration a révélé que le VIH est préférentiellement intégré parmi des introns de gènes actifs, et ce dans la même orientation de transcription que ceux-ci (Han et al., 2004; Schröder et al., 2002). De plus, parmi les provirus qui persistent durant les ART, il y a un enrichissement d'intégration au sein de gènes associés au cancer, tel *BACH2*, *STAT5B* et *MKL2*, favorisant ainsi la prolifération des cellules portant ces génomes viraux (Maldarelli et al., 2014; Wagner et al., 2014). L'intégration au sein des gènes *STAT3* et *LCK* peut même mener, en combinaison avec d'autres facteurs, au développement de lymphomes (Mellors et al., 2021).

L'expansion clonale des lymphocytes T est le résultat d'une stimulation antigénique, soit des lymphocytes T naïfs lors d'une première exposition, soit des lymphocytes T_M lors d'une réexposition. De ce fait, un clone est constitué de cellules T CD4+ partageant le même récepteur T (TCR) puisque chaque lymphocyte T CD4+ naïf possède un TCR unique, issu de la recombinaison V(D)J (Murphy, 2017; Chapitre 5 - The Generation of Lymphocyte Antigen Receptors). On peut donc établir la clonalité d'une population de cellules T CD4+ en séquençant la région V(D)J de la chaîne β réarrangée de leurs TCRs (Cohn et al., 2018; Gantner et al., 2020; Simonetti et al., 2021).

Afin d'identifier les cellules infectées, ces approches nécessitent une étape d'activation du réservoir latent. Dans la méthode **LURE** décrite précédemment (Cohn et al., 2018), les cellules T CD4+ sont stimulées 36 h à la PHA avant d'être enrichies à l'aide de billes magnétiques associées à un mélange de bNAbs. Cette étape a pour but d'enrichir en cellules qui expriment l'enveloppe virale à leur surface, avant de les trier individuellement par cytométrie en flux selon l'expression d'*env*. Les puits de cellules triées qui seront également positifs pour la production de transcrits de *gag* (PCR ARN) sont retenus pour un scRNA-seq. Pour chaque cellule dont le transcriptome est séquencé, il est alors possible d'obtenir l'étendue des gènes transcrits : ceci inclut les différents transcrits viraux, dont l'assemblage permet de reconstruire de l'ARNg complet du VIH, ainsi que l'ARNm du TCR. La stratégie utilisée dans l'étude de Gantner *et coll.* utilise pour sa part le HIV-Flow pour réactiver et isoler individuellement les cellules infectées latentes. Chaque cellule p24+ est alors triée afin que la jonction V-J de la chaîne β de son TCR soit amplifiée à l'aide d'une PCR multiplexe, puis séquencée en méthode Sanger (Gantner et al., 2020). Simonetti *et coll.*, pour sa part, sélectionnent d'abord les cellules T CD4+ répondant à des groupes de peptides de CMV ou de la protéine Gag du VIH (Simonetti et al., 2021). Ces cellules spécifiquement activées par leur antigène sont ensuite triées et soumises à amplification complète du génome (WGA; « whole genome amplification ») en dilution limite. Les puits contenant des cellules infectées sont identifiés par PCR ADN VIH, puis séquencés tant pour la chaîne β des TCR que pour leur provirus. Ces diverses études ont mis l'accent non seulement sur la contribution de la clonalité comme mécanisme de maintien du réservoir, tant parmi les cellules infectées avec un provirus intact que défectif, mais aussi de l'implication des antigènes communs, comme les virus CMV, influenza, Epstein Barr (EBV) et VIH, dans la persistance des cellules infectées.

Une troisième cible peut permettre l'évaluation de la clonalité du réservoir : la séquence provirale elle-même. Comme la réplication virale occasionne de fréquentes modifications du génome du VIH, et que la prise d'antirétroviraux bloque la possibilité de nouvelles infections, les probabilités que deux génomes parfaitement identiques proviennent de l'infection en parallèle de 2 cellules distinctes sont très faibles. On peut donc utiliser les séquences provirales identiques comme marqueurs d'expansion clonale. En raison de sa facilité, plusieurs études ont utilisé le séquençage sous-génomique comme outil d'évaluation de la clonalité du réservoir persistant (Bailey et al.,

2006; Chaillon et al., 2020; De Scheerder et al., 2019; Hosmane et al., 2017; Jones et al., 2020; Miller et al., 2019; Nolan et al., 2018; von Stockenstrom et al., 2015; Z. Wang et al., 2018). Cependant, le séquençage sous-génomique est insuffisant pour qualifier une réelle expansion clonale (Laskey et al., 2016). En effet, une même séquence d'une portion de provirus peut être associée à plus d'un site d'intégration de VIH, tandis que les séquences quasi complètes (NFL) identiques n'en partagent qu'un seul (Patro et al., 2019). Plusieurs études ont depuis étudié la clonalité du réservoir à l'aide des séquences provirales NFL (Cho et al., 2022; Hiener et al., 2017; Kuo et al., 2020; Mendoza et al., 2020; Pinzone et al., 2019; Sannier et al., 2021). De ces études, il ressort que les expansions clonales sont principalement, mais pas exclusivement (Kuo et al., 2020) composées de provirus défectifs (Hiener et al., 2017; Pinzone et al., 2019). Les clones de provirus défectifs sont fréquemment retrouvés au sein de cellules T CD4+ reconnaissant des peptides de CMV et de la capsid de VIH (Mendoza et al., 2020). Pour leur part, les rares cellules infectées avec des provirus intacts et compétents pour la réplication, détectées par qVOA, sont également maintenues par expansion clonale (Bui et al., 2017), mais sont en général dans de plus petits clones (Lorenzi et al., 2016). Sannier *et coll.* ont quant à eux démontré que les provirus identiques peuvent présenter des états d'activation transcriptionnelle et traductionnelle différents (Sannier et al., 2021). Finalement, l'analyse longitudinale des séquences de VIH sur une période minimale de 10 ans de ART a démontré qu'avec le temps, le réservoir tend à perdre sa diversité clonale (moins grand nombre de clonotypes différents) tout en montrant une augmentation de la proportion de clones cellulaires possédant un provirus intact (Cho et al., 2022).

Bien que la quantité totale d'ADN viral soit plutôt stable dans le temps une fois les ART initiés (Siliciano et al., 2003), le réservoir de cellules infectées qui persistent est quant à lui plutôt dynamique (revu dans Liu, Simonetti, & Ho, 2020). La survie des cellules T CD4+ mémoires par prolifération homéostatique (clone unique identifié à plus d'une reprise dans le temps) permet un maintien linéaire des cellules infectées. La prolifération provoquée par l'insertion du provirus dans un site d'intégration précis aura quant à elle comme effet d'accroître de façon constante certains clones. Finalement, la prolifération engendrée par la reconnaissance antigénique gouvernera la diversité clonale du réservoir en fonction des différentes phases d'expansions et

de contractions (l'effet « Wax and Wane » décrit par Z. Wang et al., 2018) (Figure 21.). Comprendre ce qui module l'expansion clonale des cellules T CD4+ infectées est intimement relié aux fondements mêmes de la mémoire de l'immunité cellulaire. Les cellules T_{CM} de façon générale sont des cellules plus polyclonales que les autres sous-types mémoires (Bretschneider et al., 2014), et il n'est donc pas surprenant de constater une plus grande proportion d'expansion clonale parmi les cellules T_{EM} et les cellules T_{TM} infectées (Gantner et al., 2020; Hiener et al., 2017; Weymar et al., 2022). Ces clones ont également tendance à être plus grands (c'est-à-dire être retrouvés en plus grand nombre de copies). La mémoire immunitaire est aussi dépendante d'une re-stimulation antigénique dans le temps. La présence d'antigènes persistants et/ou communs, comme le CMV, l'influenza, *Candida albicans*, les protéines virales du VIH, ou encore certaines composantes du microbiote intestinal, est donc intimement associée au maintien des clones T CD4+ spécifiques à ces antigènes (Gantner et al., 2020; Liu et al., 2016; Simonetti et al., 2021).

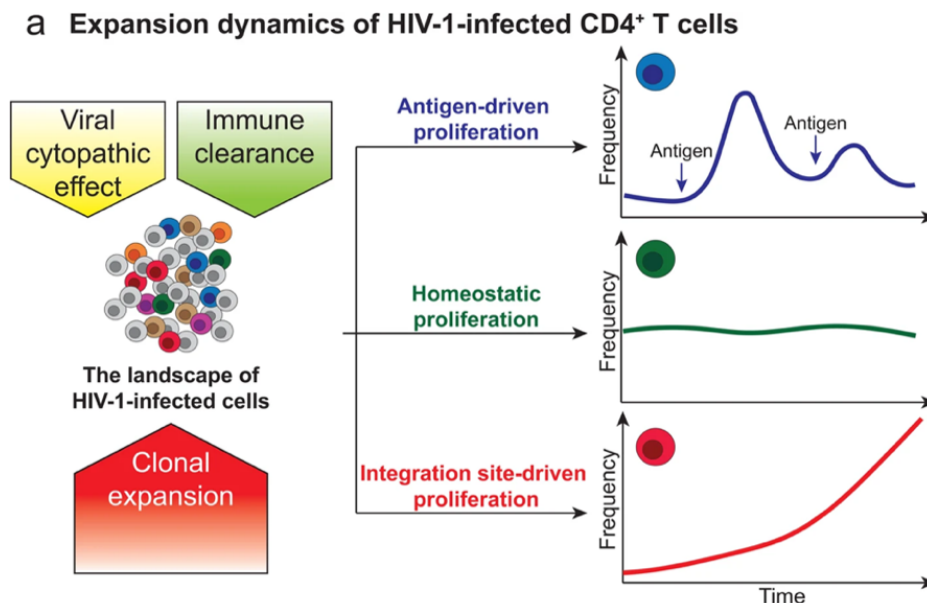


Figure 21. – Mécanismes proposés expliquant la dynamique d'expansion du réservoir au fil du temps
Une cellule infectée du réservoir peut être maintenue dans le temps par différentes phases d'expansion/contraction lorsque sa prolifération est stimulée par son TCR, par simple prolifération homéostatique afin de maintenir le lot de cellules T CD4+ mémoires, ou encore être en constante prolifération induite par la région génique où l'intégration du VIH s'est effectuée (figure 1a tirée de Liu, Simonetti, & Ho, 2020).

1.4.4.3. Mesures combinées du réservoir

Une limite majeure de plusieurs des approches de mesures du réservoir qui viennent d'être détaillées est qu'elles ne donnent souvent qu'une seule information à la fois sur le réservoir. Des mesures combinées du réservoir ont été développées depuis 2018, afin d'obtenir une image multiparamétrique des cellules, et des provirus qui y sont intégrés, chez les PVVIH sous ART. Dans la prochaine section, ces dernières avancées méthodologiques sont listées, suivies d'une brève description et des informations majeures qu'elles ont permises de mettre en lumière. Elles ont en commun d'utiliser soit des méthodes de tri de cellules individuelles, et/ou d'amplifier le génome complet des cellules afin d'obtenir plusieurs informations génétiques simultanément (Tableau 2.).

| Essai | Publication | Enrichissement/Tri | Cellule unique | MDA/WGA | Site d'intégration | TCR | HIV sous-génomique | HIV NFL | ARN viraux | Phénotype cellulaire | Transcriptome cellulaire | Épigénétique | Intégrité provirale | Compétence pour la transcription | Compétence pour la traduction | Clonalité | Inductibilité | Méthode d'activation | |
|--|--|--|----------------|---------|-----------------------------|-----|---|--|------------|----------------------|--------------------------|--------------|---------------------|----------------------------------|-------------------------------|-----------|---------------|------------------------|-----------------|
| LURE | Cohn et al. Nat Med 2018 | Enrichissement pour l'expression d'env puis tri selon expression d'env | Oui | | | Oui | | | Oui | | | | Oui | Oui | Oui | Oui | Oui | PHA | |
| MDA-SGS | Patro et al. PNAS 2019 | | | Oui | Oui | | Portion de gag-pol | 1 amplicon de ~9kb ou 4 amplicons de ~3kb se chevauchant | | | | | | | | | Oui | | |
| MIP-seq | Einkauf et al. JCI 2019 | | | Oui | Oui | | | 5 amplicons de ~2kb se chevauchant | | | | Oui | Oui | | | | Oui | | |
| Clonalité à l'aide du HIV-Flow | Gantner et al. Nat Commun 2020 | Tri selon expression de p24 par HIV-Flow | Oui | | | Oui | | | | Sous-types mémoire | | | | | Oui | Oui | Oui | PMA/Ionomyicine | |
| STIP-seq | Cole et al. Nat Commun 2021 | Tri selon expression de p24 par HIV-Flow | Oui | Oui | Oui | | | 5 amplicons de ~2kb se chevauchant | | Sous-types mémoire | | | Oui | | Oui | Oui | Oui | PMA/Ionomyicine | |
| Réactivation et intégrité à l'aide RNA Flow FISH | Sannier et al. Cell Rep 2021 | Tri selon expression d'ARN viraux par RNA Flow FISH | Oui | | | | | 1 amplicon de ~9kb | Oui | Sous-types mémoire | | | Oui | Oui | Oui | Oui | Oui | PMA/Ionomyicine | |
| Spécificité antigénique | Simonetti et al. JCI 2021 | | | Oui | Oui | Oui | | 5 amplicons de ~2kb se chevauchant | | | | | Oui | | | | Oui | | |
| PRIP-seq | Einkauf et al. Cell 2022 Lian et al. Cell Host Microbe 2022 | | | Oui | Oui | | | 5 amplicons de ~2kb se chevauchant | Oui | | | Oui | Oui | | | | Oui | Oui | PMA/Ionomyicine |
| IPSA | Joseph et al. J Virol 2022 | | | Oui | Oui | | | 1 amplicon de ~9kb | | | | | Oui | | | | Oui | | |
| ECCITE-seq | Collora et al. Immunity 2022 | Partition par gouttelettes des T CD4+ mémoires | Oui | | | Oui | | | Oui | Oui | Oui | | | Oui | Oui | Oui | Oui | CMV- ou HIV-spécifique | |
| ASAP-seq | Wu et al. Nat Immunol 2022 | Partition par gouttelettes des T CD4+ mémoires | Oui | | | | Détection de n'importe quelle portion du provirus | | | Oui | | Oui | | | | | | | |
| FIND-seq | Clark et al. Nature 2023 | Partition par gouttelettes puis détection ADN gag | Oui | | | | Détection de gag | | Oui | | Oui | | | | | | | | |
| PheP-seq | Sun et al. Nature 2023 | Partition par gouttelettes des T CD4+ mémoires | Oui | | Si site d'intégration connu | | 18 segments de 200-300pb | | | Oui | | | Oui | | | | Oui | | |

Tableau 2. – Tableau des méthodes combinant plusieurs mesures du réservoir

Ces méthodes incluent ou non une étape d'enrichissement, et utilisent souvent l'amplification du génome complet (MDA/WGA) pour détecter plusieurs cibles.

1.4.4.3.1 Combinaison de mesures avec une étape de tri cellulaire par cytométrie en flux

– **LURE** [Latent cell capture] (Cohn et al., 2018) : L'équipe de Michel C. Nussenzweig a pu déterminer, grâce à la méthode LURE présentée au point 1.4.4.2.3, l'inductibilité du provirus et sa compétente traductionnelle, tout en établissant l'intégrité provirale (par reconstruction des ARNm viraux détectés) et la séquence du TCR. Ils ont observé que les provirus des cellules obtenues par leur méthode sont identiques aux provirus intacts identifiés par qVOA, et que ces cellules partagent le même TCR, indiquant qu'elles proviennent d'une expansion clonale. De plus, on y observe un profil transcriptionnel qui promeut la latence du virus.

– **Clonalité à l'aide du HIV-Flow** (Gantner et al., 2020) : Dans l'étude de Gantner *et coll.*, les cellules du réservoir inductible et compétent pour la traduction (p24+) sont triées à l'aide de la technique de HIV-Flow, en même temps que sont indexés les marqueurs cellulaires qui permettent d'établir leur phénotype mémoire. La séquence de la chaîne β de leur TCR est ensuite amplifiée, grâce à une PCR multiplexe, puis séquencée. Ils ont ainsi constaté que le répertoire de TCR retrouvé chez les cellules p24+ est principalement composé de cellules clonales ayant un phénotype de T_{EM} . De plus, ces clones, dont certains sont spécifiques à des antigènes communs, sont pour la plupart maintenus au fil du temps.

– **STIP-seq** [Simultaneous TCR, Integration site, and Provirus sequencing] (Cole et al., 2021) : Le STIP-seq utilise le HIV-Flow pour trier les cellules p24+, avant de procéder à une amplification du génome cellulaire complet afin d'obtenir simultanément la séquence du provirus et le site d'intégration. Cette méthode, développée par le laboratoire de Linos Vandekerckhove, a mis en évidence le fait que les provirus inductibles et compétents pour la traduction sont retrouvés parmi des clones de cellules T CD4+ mémoires spécifiques pour des antigènes communs (*M. tuberculosis*, Influenza, CMV). Aussi, la majorité des génomes de VIH séquencés sont classés comme étant défectifs, bien qu'ils soient issus de cellules exprimant la capsid virale. De plus, la plupart de ces provirus sont intégrés à contresens des gènes cellulaires. Parmi les provirus intégrés dans des zones géniques, certains d'entre eux sont situés au sein de gènes connus pour stimuler la prolifération cellulaire (*STAT5B*) ou la latence profonde (*ZNF274*).

– **Réactivation et intégrité à l'aide RNA Flow FISH** (Sannier et al., 2021) : L'équipe de Daniel E. Kaufmann a amélioré son RNA Flow FISH et l'a utilisé pour caractériser génotypiquement les différentes populations transcriptionnellement actives du réservoir, qu'elles expriment ou non de la protéine de capsid virale. Ainsi, ces cellules ont été triées individuellement puis soumises au séquençage NFL de leur provirus, révélant pour la première fois que l'environnement cellulaire influence l'état d'activation du provirus. En effet, plusieurs clones de VIH sont identifiés parmi plus d'une population RNA Flow FISH. De plus, bien que ces provirus synthétisent des transcrits viraux, une minorité d'entre eux sont intacts.

1.4.4.3.2 Combinaison de mesures incluant une étape initiale d'amplification du génome complet (WGA)

— **MDA-SGS** [**M**ultiple-**D**isplacement **A**mplification-**S**ingle **G**enome **S**equencing] (Patro et al., 2019) : Les efforts de recherches des laboratoires de Marie Kearney et de John W. Mellors ont mené au premier séquençage conjoint d'une région du provirus et de son site d'intégration. Avec cette méthode combinée appliquée sur des échantillons de cellules du sang et de ganglions lymphatiques de PVVIH, ils ont démontré qu'une même séquence sous-génomique de VIH peut avoir plus d'un site d'intégration, témoignant de la nécessité d'utiliser le génome quasi complet du provirus pour évaluer la clonalité.

— **MIP-seq** [**M**atched **I**ntegration **S**ite and **P**roviral **s**equencing] (Einkauf et al., 2019) : Kevin Einkauf s'est intéressé à l'analyse concomitante du site d'intégration et du provirus quasi complet sur l'ADN extrait de PBMCs de trois PVVIH sous ART depuis une dizaine d'années. Les résultats obtenus démontrent qu'une grande proportion des provirus intacts sont intégrés au sein de régions de la chromatine exemptes de gènes. Les provirus défectifs, pour leur part, ont entre autres été retrouvés dans la même orientation que des gènes précédemment identifiés comme étant associés à la persistance virale, dont *BACH2* et *STAT5B*. Ils ont aussi évalué l'accessibilité de la chromatine près du site d'intégration, à l'aide de l'**ATAC-seq** (Buenrostro et al., 2013). Cette approche permet de mesurer la distance entre les sites d'intégrations du provirus et le site d'initiation de la transcription du gène cellulaire actif se situant le plus près. Ainsi, un enrichissement pour de plus courte distance chez les provirus intacts après des années de traitement a pu être démontré. Cette proximité engendre fort possiblement un encombrement

stérique au niveau du promoteur du VIH, favorisant ainsi la latence virale. Cette équipe a par la suite utilisé cette même méthode afin de caractériser les provirus en latence profonde chez les contrôleurs élités, les PVVIH sous traitement depuis moins de 10 ans, et celles sous traitement depuis 20-30 ans. Ils ont alors observé que les provirus intacts chez les PVVIH sous ART depuis plus de 20 ans sont principalement intégrés dans des régions de l'ADN transcriptionnellement inactives, comme ce qui est observé chez les contrôleurs élités (Lian et al., 2021). Il y aurait donc un enrichissement spécifique pour les provirus intacts en latence profonde au fil des années de traitement. Fait important, on observe aussi cet enrichissement chez les PVVIH ayant expérimenté une interruption de traitement et ayant développé un contrôle de la virémie par la suite (Lian et al., 2023).

— **Spécificité antigénique** (Simonetti et al., 2021) : Francesco R. Simonetti de l'équipe de Robert F. Siliciano a examiné les mécanismes qui influencent l'expansion clonale des cellules infectées constituant les réservoirs persistants, principalement parmi les cellules T CD4+ mémoires infectées qui répondent à des antigènes communs. Dans ce cas-ci, les séquences de la chaîne β du TCR, du site d'intégration et du génome viral quasi complet sont obtenues à partir de l'ADN extrait de cellules triées spécifiques au CMV ou au VIH provenant de 10 PVVIH sous ART. Cette étude a identifié la présence de larges clones de VIH chez les cellules T CD4+ CMV-spécifiques, dont des clones de provirus intacts. La plupart des génomes se trouvant dans des cellules ayant subi une expansion clonale sont intégrés dans des introns, et certains clones proviraux sont retrouvés parmi des gènes associés au cancer tels que *BACH2*, *STAT5B* et *MKL1*. Fait intéressant, les clones spécifiquement intégrés dans les gènes *BACH2* et *STAT5B* sont orientés dans le même sens que le gène, suggérant une prolifération induite par le site d'intégration en plus d'une expansion clonale antigénique. Finalement, l'analyse des séquences de TCR a pour sa part révélé que certains clones de lymphocytes T CD4+ ne sont qu'en partie infectés, indiquant que leur prolifération n'est pas uniquement causée par l'intégration du VIH puisqu'elle date d'avant l'infection.

— **PRIP-seq** [Parallel HIV-1 RNA, Integration site, and Proviral sequencing] (Einkauf et al., 2022) : Après le développement du **MIP-seq**, l'équipe de Mathias Lichterfeld a développé une approche multiparamétrique permettant le séquençage NFL du provirus et de son site d'intégration, mais

également des transcrits viraux, tout ça à partir d'une cellule unique infectée et isolée par dilution limite. Ils ont aussi poussé plus loin l'analyse des sites d'intégration : en plus de leur localisation et de leur orientation, ils ont également évalué l'environnement tridimensionnel de la chromatine à proximité des sites d'intégration des provirus. Ils ont établi que la configuration spatiale de l'ADN cellulaire influence l'activité transcriptionnelle du VIH, puisque les provirus produisant des ARN viraux sont situés dans des zones où on retrouve plusieurs marques épigénétiques favorables à la transcription. Ils ont observé que ces provirus transcriptionnellement actifs sont progressivement éliminés chez les PVVIH sous ART, et plus particulièrement en ce qui concerne les provirus intacts. En revanche, certains grands clones de VIH transcriptionnellement actifs, eux, sont maintenus. Ce phénomène pourrait être lié à l'intégration de ces provirus dans des zones contenant des marqueurs forts d'activation (comme la mono- [H3K4me1] ou tri-méthylation [H3K4me3] de la lysine 4 de l'histone 3, ou l'acétylation de sa lysine 27 [H3K27ac]), ou encore intégré parmi des oncogènes (tels KDM2A, CFAP299/C4orf22, USP34 et GON4L, comme rapporté dans cette étude). Finalement, ils ont démontré que la stimulation PMA/iono, considérée comme la meilleure méthode de réactivation de latence, ne parvient pas à réactiver les provirus situés dans des régions de la chromatine hautement défavorables à la transcription, mais aura plutôt comme effet d'augmenter la quantité de transcrits viraux par cellule activée.

— **IPSA** [Individual Proviral Sequencing Assay] (Joseph et al., 2022) : Le WGA/MDA nécessite une amplification aléatoire de l'ADN génomique préalablement fragmenté, faisant en sorte que le provirus, tout comme les portions d'ADN cellulaires le flanquant, se trouvent noyés dans une grande quantité de matériel génétique. Le laboratoire de John W. Mellors a développé une version modifiée du WGA afin d'améliorer le rendement de la pré-amplification pour les études de réservoirs du VIH. Ici, l'ADN génomique extrait d'un échantillon de PBMCs est d'abord distribué en dilution limite dans une plaque 96-puits. Chaque puits subit une WGA utilisant des amorces ciblant exclusivement des portions du génome humain, ce qui évite la synthèse de fragments ne couvrant qu'une partie du provirus. Une portion du matériel de WGA sert à l'amplification NFL du provirus, et les puits donnant un signal positif pour le VIH sont sélectionnés afin d'y faire l'amplification des sites d'intégrations. Non seulement cette procédure améliore la spécificité et l'efficacité de l'analyse provirale, mais elle augmente le rendement du nombre de paires « sites

d'intégration + provirus ». De plus, puisque la combinaison de ces deux informations permet d'obtenir la séquence complète des 2 LTR du provirus, les auteurs ont remarqué que près du tiers des provirus qui persistent chez les PVVIH sous ART ont une asymétrie de séquences entre le 5'LTR et le 3'LTR, c'est-à-dire qu'un des deux LTRs d'un même provirus présente une large délétion alors que le reste de leur séquence nucléotidique est identique. Cette différence de séquence est principalement due à des délétions en 3' du génome viral qui se prolonge au début du 3'LTR.

1.4.4.3.3 Méthodes combinées de mesures avec partition par microfluidique

– **ECCITE-seq** [Expanded CRISPR-compatible Cellular Indexing of Transcriptome and Epitopes by sequencing] (Collora et al., 2022) : Le laboratoire de Ya-Chi Ho a développé une approche fort ingénieuse qui permet d'obtenir, par séquençage, le transcriptome cellulaire et viral, les séquences de TCR, et le phénotype de cellules individuelles. Afin de comprendre l'impact de la prolifération induite par l'activation TCR, les cellules T CD4+ de PVVIH sont préalablement stimulés avec des peptides de VIH ou de CMV, et les lymphocytes T CD4+ mémoires spécifiques d'antigènes, exprimant CD45RO, CD69 et CD40L, sont triés. Elles sont ensuite marquées à l'aide de différents anticorps couplés à des codes-barres d'oligonucléotides (ADN de faible poids moléculaire) compatibles avec le **scRNA-seq**, afin d'identifier les protéines exprimées à la surface de ces cellules par séquençage en cellule individuelle. Le ECCITE-seq constitue donc une adaptation du **CITE-seq** (Stoeckius et al., 2017). Ce tour de force technologique, qui permet d'obtenir simultanément le transcriptome cellulaire, viral, la séquence du TCR ainsi que phénotype cellulaire pour chaque cellule infectée, a révélé qu'on retrouve, parmi le réservoir, de larges clones de cellules T CD4+, à la spécificité antigénique connue (CMV- et VIH-spécifique) ou non, et que ceux-ci persistent de façon stable après l'initiation des ART. Ces clones se trouvent principalement parmi les cellules T_{EM} ayant un profil effecteur Th1 cytotoxique (*GZMB*+), et exprimant plus de *BCL2L1* (molécule de survie) et de *SERPINB9* (molécule protectrice contre l'apoptose causée par les granules cytotoxiques). L'expression de ces deux gènes parmi les cellules infectées qui persistent dans le temps confère une résistance face à l'activité cytotoxique des T CD8+ VIH-spécifiques, ce qui pourrait expliquer leur survie.

– **ASAPseq** (ATAC [single-cell Assay for Transposase Accessible Chromatin] with Select Antigen Profiling sequencing) (Wu et al., 2023) : Vincent H. Wu a appliqué la méthode ASAPseq (Mimitou et al., 2021), une combinaison du **CITE-seq** et de l'**ATACseq**, à des cellules T CD4+ mémoires enrichies de PVVIH sous ART. Ceci permet d'utiliser le séquençage ARN de cellules uniques pour obtenir les informations concernant l'accessibilité de la chromatine et le niveau d'expression protéique à la surface. Les cellules infectées, non stimulées *in vitro*, sont identifiées en fonction de la détection d'une portion du génome viral suite au séquençage ATAC-seq. Dans les tissus lymphoïdes, les cellules infectées sont surtout parmi les cellules T_{FM} (T mémoire folliculaire), les cellules T_{RM} (T mémoires résidentes des tissus) et les cellules T_{CM} exprimant plus de CD71 à leur surface, un marqueur d'activation et de prolifération. Ces cellules ont aussi une chromatine plus accessible près des gènes codant pour les facteurs de transcription POU2F3 et BACH1, ainsi que ceux de la famille AP-1. Les cellules T CD4+ mémoires en circulation, elles, sont plutôt retrouvées parmi les cellules T_{CM}, les cellules Th2, les cellules T_{FH} circulantes (cT_{FH}), les lymphocytes T invariants associés aux muqueuses (MAIT) et les cellules T_{EM}. On y retrouve de plus hauts niveaux d'expression de molécules d'activation et de costimulation (CCR5, PD-1 et CD2) et une meilleure accessibilité de la chromatine pour les gènes des facteurs de transcription BACH2 et de la famille AP-1. En revanche, ces différentes populations expriment intrinsèquement des niveaux de molécules de surface variables : par exemple, les T_{FH} ont naturellement une plus forte expression des marqueurs d'activation que sont CD71, HLA-DR, ICOS et PD-1, alors que le groupe T_{CM}/T_{TM} de cellules infectées (incluant les T_{CM}, les T_{TM}, et les cTFH) démontre ici une expression préférentielle de la molécule d'adhésion CD2 et du co-récepteur du VIH CCR5. Cette étude illustre ainsi toute l'hétérogénéité phénotypique des cellules infectées composant le réservoir.

—**FIND-seq** [Focused Interrogation of cells by Nucleic acid Detection and sequencing] (Clark et al., 2023): C'est grâce à l'ingénierie de la microfluidique que l'étude de Clark *et coll.* a mis au point une première méthode pour trier individuellement les cellules infectées et latentes, sans nécessiter une étape de réactivation. Chaque cellule, infectée ou non, est incorporée dans une goutte d'émulsion lipidique. Les gouttes, contenant l'ADN et tous les transcrits ARN de chaque cellule, sont ensuite refroidies afin de former un gel compartimenté. Ensuite, des étapes de lyse et d'incubation avec une transcriptase inverse permettront de convertir tous les transcrits

présents dans chaque gouttelette en ADNc. Celles-ci sont finalement triées, en fonction d'un signal positif de fluorescence pour l'ADN *gag*, afin d'obtenir leur transcriptome. Ils ont ainsi caractérisé le transcriptome propre aux cellules infectées et latentes, révélant qu'elles ont une perte d'expression de gènes favorisant la mort cellulaire, tout en exprimant de plus hauts niveaux de gènes associés à la répression de la transcription virale. Ces cellules ont par conséquent un profil transcriptionnel favorisant leur survie cellulaire et la latence virale.

– **PheP-seq [Phenotypic and Proviral sequencing]** (Sun et al., 2023) : Le PheP-seq, une adaptation du **CITE-seq** qui a attiré l'attention en début d'année, puisqu'il permet d'identifier et de phénotyper les cellules infectées sans les stimuler. De plus, au lieu de séquencer le transcriptome, cette technique amplifie le génome viral, en 18 petits fragments de 200-300 pb qui incluent les régions utilisées par le IPDA afin d'évaluer l'intégrité des provirus, et une portion du site d'intégration en 5', connue d'études précédentes sur les mêmes échantillons, afin d'évaluer la clonalité (Figure 23.).

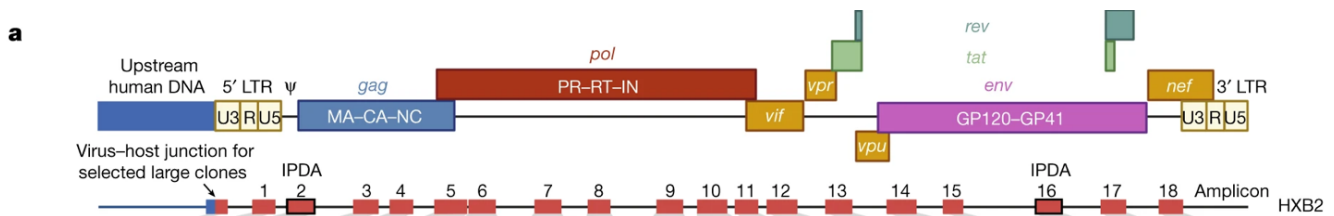


Figure 22. – Localisation des 18 fragments du génome viral amplifiés par le PheP-seq
L'amplification de 18 fragments du génome de VIH, incluant les deux régions du IPDA (#2 et #16), permet d'évaluer l'intégrité du provirus (figure 1a tirée de Sun et al., 2023).

Les auteurs ont pu ainsi comparer le phénotype des cellules infectées portant un provirus intact, clonales ou non, avec celui des cellules non infectées, au fil du temps. Les génomes de VIH intacts sont principalement retrouvés parmi les cellules T_{EM} en circulation qui expriment des niveaux plus élevés de molécules de points de contrôles immunitaires, connus pour favoriser la latence (PD-1, TIGIT, BTLA et KLRG1) ainsi que les ligands de ces molécules (HVEM, PVR et PD-L1), ce qui pourrait favoriser l'échappement immunitaire face à l'action des cellules T CD8⁺ et NK. De plus, les clones, intacts ou non, montrent plus fréquemment une co-expression d'au moins trois de ces marqueurs. Au niveau des ganglions lymphatiques, les provirus intacts sont plutôt retrouvés

parmi les cellules T_{FH} et les lymphocytes T_{RM} exprimant des molécules associées à la survie cellulaire (CD44, CD127/IL-7R, CD360/IL-21R et CD28). Finalement, ils ont également mesuré l'évolution de l'expression des protéines de surface sous ART, et ont spécifiquement remarqué une augmentation dans l'expression de CD49d (la sous-unité d'intégrine α 4) sur les cellules portant un provirus intact.

Si l'on combine les résultats de toutes ces études, il en ressort que :

- La majorité des provirus produisant des transcrits viraux, et même des protéines de la capsid virale, sont défectifs;
- Le réservoir du VIH qui persiste au cours des ART est en grande partie clonal, incluant de larges clones qui sont vraisemblablement établis avant l'initiation des ART. Ceux-ci sont souvent spécifiques à des antigènes communs et récurrents (CMV, influenza et HIV) qui favorisent leur maintien dans le temps grâce à une stimulation TCR fréquente. D'autres sont maintenus en raison de leur site d'intégration, puisqu'ils sont intégrés dans des gènes associés à la prolifération cellulaire (*BACH2*, *STAT5B*);
- Les cellules du réservoir ont un profil transcriptionnel favorisant la survie cellulaire et la prolifération (surexpression de *TLN1*, *USP19* et *LRRFIP2*), la répression de la transcription virale (surexpression des régulateurs négatifs *EHMT1*, *RBBP4*, *MTA1* et *CTR9*, et sous-expression des régulateurs positifs *GTF21*, *MAPKAPK3*, *NCOA1* et *SNW1*), ainsi que la résistance à l'action cytotoxique des T CD8+ (expression de *BCL2L1*, *SERPINB9*);
- Les provirus intacts sont fréquemment retrouvés au sein de clones, surtout des cellules T_{EM} en circulation exprimant des molécules favorisant la latence (PD-1, TIGIT, BTLA et KLRG1) et l'échappement à la réponse cytotoxique des cellules T CD8+ et NK (HVEM, PVR et PD-L1).

De plus, des analyses longitudinales du réservoir durant les ART dans certaines de ces études ont montré que :

- Les cellules infectées transcriptionnellement actives sont soumises à une pression immunitaire plus grande, et sont donc plus rapidement éliminées au fil des années;
- L'expansion clonale contrecarre l'élimination des provirus transcriptionnellement actifs;

- Les provirus intacts expriment de plus en plus de CD49d ($\alpha 4$) à leur surface avec le temps.

Cependant, seulement trois de ces études ont réalisé une amplification quasi complète du génome viral en un seul fragment (Joseph et al., 2022; Patro et al., 2019; Sannier et al., 2021), procédé associé à des erreurs d'assemblage *in silico* qui peuvent interférer dans l'évaluation de l'intégrité. D'autre part, moins de la moitié des méthodes combinées évaluent l'inductibilité du réservoir, qui est pourtant essentielle à la qualification de réservoirs cliniquement pertinents. Ces deux facteurs ont été au cœur des projets d'études de cette thèse.

1.5. Objectifs de la thèse de recherche

L'infection au VIH est une pathologie complexe, et le virus n'est jamais éliminé de l'organisme, à l'exception de quelques rares cas. Aucun traitement curatif n'existe à ce jour. Les réservoirs de cellules infectées latentes restent non seulement invisibles face à la réponse immunitaire, mais subsistent durant des dizaines d'années de ART. Les réservoirs ne sont pas des éléments statiques, comme initialement suspectés, et leur dynamique est sous l'influence de plusieurs facteurs : la génétique de la PVVIH, la localisation de l'intégration provirale, la pression immunitaire, la spécificité antigénique de la cellule infectée, les régimes d'ARVs, le temps avant l'initiation des ART, et la durée de la suppression de la charge virale.

Une autre particularité des réservoirs de cellules infectées qui persistent est la grande proportion de provirus défectifs. Ces provirus sont catégorisés comme incompetents pour la réplication, bien que certains soient tout de même compétents pour la transcription et/ou la traduction. En revanche, un provirus intact n'est pas systématiquement capable de causer un rebond de charge virale plasmatique : il faut que celui-ci soit dans un contexte épigénétique ou chromosomique qui permette sa réactivation. L'intégrité génomique des réservoirs est donc tout aussi importante que leur inductibilité, qui est, elle, dépendante de l'environnement cellulaire et du site d'intégration (Tableau 3.). De plus, la majorité des données concernant l'intégrité des réservoirs nous parviennent d'études effectuées sur des échantillons de PBMCs, et rares sont les informations concernant les réservoirs intacts au sein des tissus profonds.

Il manque encore certaines informations essentielles à la compréhension des réservoirs qui persistent sous ART chez les PVVIH. Au cours de mon parcours doctoral, nous avons voulu approfondir, à l'aide de deux études présentées aux chapitres 2 et 3, nos connaissances concernant :

- Le phénotype des cellules du réservoir portant un provirus intact, inductible et compétent pour la réplication virale,
- La cartographie et l'intégrité des réservoirs anatomiques,
- L'implication et l'importance de l'expansion clonale dans la persistance du VIH.

| Provirus compétents pour la réplication | Provirus inductibles | Provirus intacts |
|--|--|---|
| Fréquence d'environ 1 par million de CD4 (Chun et al., Nature 1997) | Principalement défectifs, même s'ils produisent des transcrits viraux ou de la capsidie (Cole et al., Nat Commun 2021) (Sannier et al., Cell Rep 2021) | Représentent 2-14% de tous les provirus qui persistent dans la circulation (Ho et al., Cell 2013) (Bruner et al., Nat Med 2016) (Lee et al., J Clin Invest 2017) (Hiener et al., Cell Rep 2017) (Gaebler et al., J Exp Med 2019) (Kuo et al., J Infect Dis 2020) (Horsburgh et al., AIDS 2020) (Gaebler et al., J Virol 2021) (Morcilla et al., mBio 2021) (Cho et al., Proc Natl Acad Sci U S A 2022) (Duette et al., J Clin Invest 2022) |
| Ne sont pas éliminés par les TAR (Wong et al., Science 1997) (Finzi et al., Science 1997) | Provirus compétents pour la transcription qui sont intégrés dans des zones avec plusieurs marques épigénétiques favorables à la transcription (Einkauf et al., Cell 2022) | Retrouvés parmi des expansions clonales (Simonetti et al., Proc Natl Acad Sci U S A 2016) (Lee et al., J Clin Invest 2017) (Hiener et al., Cell Rep 2017) (Pinzone et al., Nat Commun 2019) (Einkauf et al., J Clin Invest 2019) (Patro et al., Proc Natl Acad Sci U S A 2019) (Horsburgh et al., AIDS 2020) (Cole et al., Nat Commun 2021) (Simonetti et al., J Clin Invest 2021) (Einkauf et al., Cell 2022) (Sun et al., Nature 2023) |
| Génétiquement intacts (Ho et al., Cell 2013) | Provirus compétents pour la transcription retrouvés parmi les T _{EM} et les T _{CM} (Sannier et al., Cell Rep 2021) | Retrouvés de plus en plus fréquemment parmi des expansions clonales avec le temps (Cho et al., Proc Natl Acad Sci U S A 2022) |
| Ne sont pas tous réactivés après une première stimulation (Ho et al., Cell 2013) | Provirus compétents pour la traduction qui possèdent un répertoire de TCR qui est surtout retrouvés parmi les T _{EM} (Gantner et al., Nat Commun 2020) | Identiques à ceux retrouvés en qVOA (Lee et al., J Clin Invest 2017) (Einkauf et al., J Clin Invest 2019) (Pinzone et al., Nat Commun 2019) |
| Retrouvés en grande partie au sein d'expansions clonales (Bui et al., PLoS Pathog 2017) | Provirus compétents pour la traduction retrouvés parmi les T _{TM} et les T _{EM} (Pardons et al., PLoS Pathog 2019) | Composés de clones retrouvés dans le sang et dans les ganglions lymphatiques (Kuo et al., J Infect Dis 2020) |
| Retrouvés parmi des clones qui vont et viennent avec le temps (Wang et al., Proc Natl Acad Sci U S A 2018) | Provirus compétents pour la traduction intégrés dans des cellules mémoires exprimant PD-1, TIGIT et VLA-4 (α4β1) (Pardons et al., PLoS Pathog 2019) | Retrouvés au niveau du système nerveux centrale (Cochrane et al., Ann Neurol 2022) |
| Retrouvés parmi des T CD4+ capables de proliférer sans pour autant que le génome viral ne soit réactivés (Hosmane et al., J Exp Med 2017) | Provirus compétents pour la traduction intégrés dans des cellules mémoires exprimant de plus hauts niveaux de BCL-2 (Ren et al., J Clin Invest 2020) | Provirus plus rapidement éliminés avec le temps après l'initiation des ART que les cellules avec un provirus défectifs (Bruner et al., Nature 2019) (Peluso et al., JCI Insight 2020) (Gandhi et al., J Infect Dis 2021) (Cho et al., Proc Natl Acad Sci U S A 2022) (White et al., Proc Natl Acad Sci U S A 2022) |
| Retrouvés parmi les T CD4+ CD32a+ (Descours et al., Nature 2017) | | Éliminés avec le temps lorsqu'ils sont transcriptionnellement actifs (Pinzone et al., Nat Commun 2019) (Einkauf et al., Cell 2022) |
| Retrouvés parmi les T CD4+ CD161+ (Li et al., mBio 2019) | | Surtout intégrés dans régions non géniques, et dans le sens opposé de la transcription (Einkauf et al., J Clin Invest 2019) |
| Enrichis parmi les T _{FH} (CXCR5+ PD-1+ Bcl-6+) isolés des ganglions lymphatiques (Perreau et al., J Exp Med 2013) | | Surtout intégrés dans l'hétérochromatine lorsqu'ils isolés des ganglions lymphatiques (Lian et al., Cell Host Microbe 2022) |
| Enrichis parmi T CD4+ mémoires exprimant CXCR3 (Banga et al., Front Immunol 2018) | | Avec le temps, ils sont de plus en plus retrouvés en proximité d'un site d'initiation de la transcription, causant possiblement un encombrement stérique qui favorise la latence (Einkauf et al., J Clin Invest 2019) |
| | | Surtout retrouvés parmi les T _{EM} (CD4+ CD45RO+ CCR7- CD27-) (Hiener et al., Cell Rep 2017) (Duette et al., J Clin Invest 2022) (Sun et al., Nature 2023) |

| |
|--|
| Enrichis en cellules mémoires ayant une plus courte durée de vie (T_{EM} et T_{TM}) (Morcilla et al., mBio 2021) |
| Enrichis en Th1 (CD4+ CD45RO+ IFN- γ) (Lee et al., J Clin Invest 2017) |
| Retrouvés au sein des Th2 (CD4+ CD45RA- CXCR3- CXCR5- CCR4+ CCR6-) (Kuo et al., J Infect Dis 2020) |
| Parmi les cellules activées (CD4+ CD45RA- HLA-DR+) (Horsburgh et al., AIDS 2020) |
| Retrouvés dans des cellules exprimant plus de molécules de points de contrôle immunitaires, connus pour favoriser la latence (PD-1, TIGIT, BTLA et KLRG1) et de ligands de ces molécules de points de contrôle (HVEM, PVR et PD-L1) (Sun et al., Nature 2023) |
| Retrouvés dans des cellules où l'expression de CD49d (la sous-unité d'intégrine $\alpha 4$) tend à augmenter avec le temps (Sun et al., Nature 2023) |

Tableau 3. – Résumé des informations recueillies concernant les provirus compétents pour la réplication, les provirus inductibles, et les provirus intacts.

Chapitre 2 – Caractérisation phénotypique de cellules T CD4+ individuelles dans lesquelles persistent les génomes de VIH génétiquement intacts et inductibles

2.1. Aperçu du projet

2.1.1. Contexte et hypothèse

Le phénotype des cellules T CD4+ portant des génomes viraux intacts et inductibles demeure à ce jour inconnu. Le HIV-Flow est un outil qui permet d'évaluer l'inductibilité du réservoir tout en le quantifiant. Les cellules infectées réactivées sont identifiées par cytométrie en flux, en fonction de leur capacité à produire une protéine virale, la capsid (p24). Un des avantages majeurs du HIV-Flow est qu'il permet de caractériser les différents marqueurs cellulaires exprimés par les cellules p24+, et donc d'établir leur phénotype. Nous avons émis l'hypothèse que le réservoir compétent pour la traduction est enrichi en provirus intacts, et qu'il est ainsi possible d'établir le phénotype des cellules infectées portant un provirus potentiellement compétent pour la réplication.

2.1.2. Objectif

Nous avons exploité le HIV-Flow, développé dans notre laboratoire, pour trier individuellement les cellules p24+ de 6 PVVIH sous ART, tout en indexant l'expression de 8 protéines cellulaires. Suite au tri, les provirus ont été amplifiés et séquencés dans leur quasi-totalité, à l'aide d'une approche modifiée de l'essai FLIPS et de la méthode de séquençage de nouvelle génération PacBio. Notre premier objectif est de comparer le génotype des provirus inductible et compétent pour la traduction aux provirus retrouvés dans la fraction non-induite (p24-). Notre deuxième objectif vise à établir un profil phénotypique identifiant les cellules inductibles dont le provirus est intact.

2.1.3. Statut de l'article

Cet article a été accepté pour publication dans la revue *Nature Communications* le 10 février 2023, et publié en ligne le 27 février 2023 (<https://www.nature.com/articles/s41467-023-36772-x#citeas>).

2.1.4. Contribution détaillée de chacun des auteurs

J'ai personnellement effectué plus de 75% du travail de laboratoire associé à ce projet. J'ai d'abord développé la méthode NFL adapté à la cellule unique, ainsi que la procédure de séquençage PacBio et la méthodologie d'analyse d'intégrité. J'ai ensuite conceptualisé et réalisé toutes les expériences de tri ainsi qu'une partie des expériences de qVOA, en plus d'être responsable de l'analyse de l'intégrité et de la clonalité des séquences provirales. J'ai effectué toutes les analyses de données, construit les figures et écrit l'article. Corentin Richard (sous la supervision de Bertrand Routy) et Ben Murrel ont eu la charge de la portion d'analyse bio-informatiques des données brutes de séquençage PacBio. Rémi Fromentin a participé à la conception et à la réalisation des expériences de qVOA. Antoine Ackaoui a réalisé une partie des expériences de qVOA. Marion Pardons et Marta Massanella ont fourni une aide précieuse dans la conception des expériences. Réjean Thomas et Jean-Pierre Routy sont deux cliniciens responsables du recrutement de notre cohorte de PVVIH. Nicolas Chomont, à titre de directeur de laboratoire, a supervisé chaque étape, de la conception à l'interprétation des résultats et à l'édition de l'article. Tous les co-auteurs ont fourni leurs commentaires et approuvé leur contribution à l'article.

2.1.5. Résumé

Le phénotype des rares cellules infectées par le VIH qui persistent malgré des années de ART reste inconnu. Dans cet objectif, nous avons développé une approche au niveau de la cellule unique qui combine l'analyse phénotypique des cellules infectées par le VIH et le séquençage quasi complet de leurs provirus, afin de caractériser le réservoir viral chez 6 hommes sous ART.

Nous avons observé que des cellules portant un provirus identique, constituant une expansion clonale, présentent des phénotypes variés, suggérant que la prolifération cellulaire a pour effet

d'accroître la diversité phénotypique du réservoir du VIH. De plus, contrairement à la plupart des génomes de VIH qui persistent, les provirus inductibles et compétents pour la traduction présentent rarement de grandes délétions, mais sont enrichis en défauts dans le locus Ψ . Pour leur part, les quelques cellules hébergeant des génomes viraux génétiquement intacts et inductibles expriment de plus hauts niveaux de l'intégrine VLA-4, comparativement aux cellules non infectées ou aux cellules portant des provirus défectueux. L'analyse par qVOA a confirmé que les cellules T CD4+ mémoires exprimant des niveaux élevés de VLA-4 sont fortement enrichies en provirus compétents pour la réplication (enrichissement de 27 fois).

Bien que les expansions clonales diversifient le phénotype des cellules réservoirs du VIH, nous concluons que les cellules T CD4+ où persistent les provirus compétents pour la réplication conservent une forte expression de VLA-4.

2.2. Article #1: Phenotypic characterization of single CD4+ T cells harboring genetically intact and inducible HIV genomes

Caroline Dufour¹, Corentin Richard¹, Marion Pardons¹, Marta Massanella¹, Antoine Ackaoui¹, Ben Murrell², Bertrand Routy¹, Réjean Thomas³, Jean-Pierre Routy⁴, Rémi Fromentin¹, Nicolas Chomont^{1*}

¹Centre de Recherche du CHUM and Department of Microbiology, Infectiology and Immunology, Université de Montréal, Montreal, H2X 0A9, Quebec, Canada

²Department of Microbiology, Tumor and Cell Biology, Karolinska Institutet, Stockholm, 171 77, Sweden

³Clinique médicale l'Actuel, Montreal, H2L 4P9, Quebec, Canada

⁴Division of Hematology & Chronic Viral Illness Service, McGill University Health Centre, Montreal, H4A 3J1, Quebec, Canada

* Corresponding author:

Nicolas Chomont

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

Tel: +1 514-890-8000 #31266

E-mail: nicolas.chomont@umontreal.ca

Keywords: HIV reservoir, sequencing, clonal expansion, inducibility, HIV-Flow, replication-competent reservoir, VLA-4, $\alpha 4\beta 1$

Abstract

The phenotype of the rare HIV-infected cells persisting during antiretroviral therapies (ART) remains elusive. We developed a single-cell approach that combines the phenotypic analysis of HIV-infected cells with near full-length sequencing of their associated proviruses to characterize the viral reservoir in 6 males on suppressive ART. We show that individual cells carrying clonally expanded identical proviruses display very diverse phenotypes, indicating that cellular proliferation contributes to the phenotypic diversification of the HIV reservoir. Unlike most viral genomes persisting on ART, inducible and translation-competent proviruses rarely present large deletions but are enriched in defects in the Ψ locus. Interestingly, the few cells harboring genetically intact and inducible viral genomes express higher levels of the integrin VLA-4 compared to uninfected cells or cells with defective proviruses. Viral outgrowth assay confirmed that memory CD4⁺ T cells expressing high levels of VLA-4 are highly enriched in replication-competent HIV (27-fold enrichment). We conclude that although clonal expansions diversify the phenotype of HIV reservoir cells, CD4⁺ T cells harboring replication-competent HIV retain VLA-4 expression.

Introduction

Latent HIV genomes permanently integrated in a small pool of CD4+ T cells persist during antiretroviral therapy (ART) and represent the major obstacle to a cure^{1, 2, 3, 4}. ART abrogates HIV replication but has no impact on latently infected cells and hence, does not eradicate the virus. HIV latency is characterized by multiple and non-mutually exclusive features, including proviral integration into less transcriptionally active regions of the chromatin^{5, 6, 7, 8}, lack of essential transcription and elongation cellular factors^{9, 10} and moderate activation status of the infected cell¹¹, which all contribute to HIV silencing. Nevertheless, viral rebound occurs shortly after ART interruption in most people living with HIV (PLWH)¹², indicating that productive infection can reignite from latent viral reservoirs.

The half-life of the replication-competent viral reservoir in PLWH on ART has been estimated to 44 months^{13, 14, 15, 16}, and this longevity is attributed to the survival, self-renewal and proliferative capacities of infected memory CD4+ T cells^{17, 18, 19, 20, 21, 22}. Accumulating evidence indicates that cell proliferation plays a major role in the persistence of HIV reservoirs. Using sequencing of integrations sites^{21, 22, 23, 24}, near full-length (NFL) proviruses^{25, 26, 27, 28, 29, 30}, T cell receptors (TCR)^{31, 32, 33} or combinations of these approaches^{33, 34, 35, 36, 37}, numerous studies have highlighted the major contribution of clonal expansion to HIV persistence. Since clonal expansion of CD4+ T cells harboring viral genomes does not necessarily lead to viral production nor to the clearance of the infected cell³⁸, sequential waves of antigen-induced expansions and contractions result in dynamic changes within the reservoir during ART³². Although it is clear that these sequential episodes of expansions influence the genetic diversity of the proviral populations, their impact on the phenotypic diversity of the cells carrying persistent HIV remain unknown³⁹. As such, whether individual cells belonging to a single proviral clone display similar phenotypes is unclear.

Several cellular markers that enrich in HIV reservoirs have been identified (reviewed in⁴⁰). Within the CD4+ T cell compartment, HIV is enriched in cells displaying a central (T_{CM}) and effector memory (T_{EM}) phenotype^{18, 19, 20, 25, 41, 42, 43, 44}, in cells expressing the immune checkpoint molecules PD-1 (programmed death-1), TIGIT (T-cell immunoglobulin and ITIM domain) and LAG-3 (lymphocyte activation gene 3)^{18, 45, 46, 47, 48}, as well as the activation markers HLA-DR and ICOS^{49, 50}. Other cell-surface markers enriching in persistent HIV genomes include the adhesion molecule

CD2⁵¹, the TNF receptor CD30⁵², the FC gamma receptor CD32^{53, 54}, the homing receptor VLA-4⁵⁰ and the B cell marker CD20⁵⁵. Additional discrete CD4+ T cell subsets enriched in HIV-infected cells have been described, including stem cell memory T cells (T_{SCM})^{19, 20}, regulatory T cells (T_{reg})^{56, 57, 58}, T follicular helper cells (T_{FH})^{46, 47}, and functionally polarized Th1⁵⁹, Th2³⁰ and Th17 cells⁶⁰. However, most of these studies used HIV DNA measures as surrogate of the HIV reservoir, an approach that is known to largely overestimate the size of the replication-competent reservoir, since most HIV genomes persisting during ART are genetically defective^{25, 59, 61, 62, 63}. While a significant proportion of these proviruses retains the capacity to transcribe viral RNAs and to produce viral proteins^{8, 27, 50, 64, 65}, only a small fraction can produce infectious virions and represent a potential source of viral rebound. If the genetic intactness of these proviruses is a prerequisite to their ability at causing rebound, their inducibility is also critical but has rarely been evaluated^{15, 25, 26, 59, 62, 66}, (reviewed in ⁶⁷). As such, genetically intact genomes persisting in a deeply latent state and which are difficult to reactivate may be less clinically relevant than those from which viral production can be induced^{8, 68, 69}.

Here, we used a combination of approaches to obtain the phenotype of CD4+ T cells harboring genetically intact and inducible HIV proviruses in individuals on prolonged ART.

Results

Combined phenotypic and genotypic analysis of the inducible and translation-competent reservoir

To analyze the genetic integrity of inducible HIV genomes persisting in latently infected cells and assess their phenotypes, we developed a single-cell approach that combines indexed single-cell sorting of p24⁺ cells (HIV-Flow, which allows the isolation of single cells with retrospective identification of each single cell's high-dimensional immune phenotype⁵⁰) with near full-length (NFL) proviral sequencing (Fig.1a). To obtain NFL HIV sequences from single sorted cells, we modified the FLIPS assay originally described by Hiener *et al.*²⁵ by designing primers with degenerated nucleotides to capture a larger proportion of HIV genomes, by using a novel high-fidelity enzyme that maximizes long-range amplification with minimal error-rate, and by using the PacBio next-generation sequencing platform which provides excellent fidelity and avoids the need for sequence reconstruction. We first evaluated the efficacy and fidelity of our sequencing approach by sorting single ACH-2 cells (harboring a single copy of HIV provirus⁷⁰) and amplified their viral genomes using our optimized protocol (Fig.S1a). NFL genomes were successfully amplified in 71% of the wells containing a single HIV-infected ACH-2 cell. PacBio sequencing yielded extremely low error rate: 1 in 34,025 nucleotides, with 97% of NFL sequences showing 100% identity (Fig.S1a). We used this approach to obtain the phenotype and proviral sequences of HIV-infected cells harboring inducible proviruses in blood samples from 6 PLWH on suppressive ART for a median of 9.5 years (Table 1). PMA/ionomycin was used to induce p24 production from latent proviruses. The expression levels of 8 cellular markers previously described to enrich in HIV-infected cells (PD-1, TIGIT, HLA-DR, ICOS, α 4, β 1, CD45RA and CCR7^{18, 45, 49, 50}) and which expression were not modified by the stimulation in the presence of brefeldin A (BFA), were simultaneously recorded (Fig.1b and S1b). We obtained a total of 308 NFL sequences from single-sorted p24⁺ cells (range: 41-59 sequences per participant). To analyze the proviral landscape of the non-induced and/or translation-incompetent reservoir in these same individuals, we also obtained 326 sequences from serially diluted p24⁻ cells (range: 24-76 sequences per participant). We constructed phylogenetic trees containing genomic sequences derived from p24⁺ and p24⁻ cells (Fig.2a-f). In all 6 participants, proviral sequences retrieved from p24⁺ cells

and p24⁻ cells were intermingled, indicating that inducible and translation-competent proviruses do not cluster separately from viral genomes that cannot produce p24 upon reactivation.

The inducible and translation-competent reservoir is highly clonal

Since clonal expansion is a major mechanism by which latently infected CD4⁺ T cells persist during ART^{23, 31, 32, 33, 34, 71}, we estimated the contribution of cell proliferation to the maintenance of the inducible and non-induced reservoirs by determining the proportions of duplicated proviral sequences in both compartments. Clonal expansions of HIV-infected cells were detected in both the p24⁺ and p24⁻ fractions in all participants (Fig.S2a). Duplicated HIV genomes were more frequently found in p24⁺ cells compared to p24⁻ cells (means 78.9% vs 50.0%, respectively, $p < 0.0001$) (Fig.3a). In line with this observation, large clonal expansions of HIV genomes (≥ 5 copies per clone) were found at a higher proportion in p24⁺ cells when compared to their negative counterparts (40.7% vs 11.4%, respectively, Fisher's exact test $p = 0.0073$) (Fig.3b). Interestingly, proviral sequences shared between the induced and non-induced reservoirs were frequently observed (16 clones in 5/6 participants, Fig.3c), indicating that within an infected T cell clone, individual genomes can vary in their ability to get reactivated upon a single round of stimulation. Altogether, these results highlight the prominent role of T cell proliferation in the maintenance of the inducible and translation-competent HIV reservoir, suggesting that these cells can evade immune recognition during this process. In addition, the observation that genetically identical proviruses are often found in both p24⁺ and p24⁻ cells indicates that inducibility does not solely depend on the viral sequence and suggests that cellular features may influence the inducibility of a latent provirus.

Clonally-expanded inducible proviruses are found in phenotypically different cells

Having demonstrated that the inducible and translation-competent reservoir is highly clonal, we sought to identify a phenotypic signature of these expanded proviral populations. For each individual p24⁺ cell, we linked the level of expression of the 8 cellular markers recorded during cell sorting (PD-1, TIGIT, HLA-DR, ICOS, $\alpha 4$, $\beta 1$, CD45RA and CCR7) to their cognate proviral

sequence (obtained by NFL genome sequencing). For each cellular marker, we calculated the ratio between the fluorescence intensity measured on a single p24+ cell (n=239) and the mean fluorescence intensity (MFI) of all CD4+ T cells from the same participant. In line with previous studies^{18, 45, 50}, p24+ cells tended to express higher levels of $\alpha 4$ and $\beta 1$ (mean ratio of 2.17 and 1.26, respectively) and lower levels of CD45RA and CCR7 when compared to the global pool of CD4+ T cells (Fig.4a and S3a). Unexpectedly, individual p24+ cells belonging to a given clonally expanded population expressed highly variable levels of most cellular markers analyzed (Fig.4b), with the highest variations observed for $\alpha 4$, $\beta 1$ and CCR7 (standard deviation of 1.18, 0.42 and 0.38, respectively, Fig.4a and S3b). In line with previous studies^{25, 31, 49}, clonally expanded proviruses were less frequently found in T_{CM} cells (65.4%), compared to T_{EM} cells (81.4%; p=0.0041) and in cells expressing TIGIT (86.5%, p= 0.006), HLA-DR (84.8%; p=0.0077) and $\alpha 4\beta 1$ (78.1%; p=0.025) (Fig.4c).

Altogether, our results indicate that while clonal expansions are primarily detected in differentiated and activated CD4+ T cells, identical proviruses are found in p24+ cells displaying very diverse phenotypes, suggesting that clonal expansion contributes to the phenotypic diversification of HIV reservoir cells.

Inducible and translation-competent proviruses display distinct defects compared to non-induced proviruses

We then compared the integrity of HIV genomes from the inducible (Fig.5a) and non-induced reservoirs (Fig.5b). Proviruses retrieved from p24+ cells were significantly longer than those isolated from p24- cells (median lengths of 9,027bp and 4,804bp, respectively, p<0.0001), reflecting the frequent large deletions observed in non-induced proviruses (Fig.5c). We then evaluated integrity by interrogating sequentially all proviral sequences for the presence of different genetic defects: Each provirus was analyzed for the presence of inversion, hypermutations, large internal deletions, deleterious stop codons in any of the coding regions apart from *nef*, defects in the packaging signal including deletion in one of the 4 stem loops or a point mutation in the major splice donor (MSD) site, and finally internal deletions larger than 5%

of the ORF (Fig.1a). Proviral sequences devoid of any of these defects were considered genetically intact^{25, 44}. Defects displayed by HIV genomes isolated from p24⁻ cells were similar to what was previously reported^{25, 59, 62} with 77.6% of the viral sequences with large internal deletions, 8.0% with hypermutation, 6.8% with defects in the Ψ locus, 2.8% with inversions and 2.8% with deleterious stop codons. In sharp contrast, proviruses retrieved from the inducible and translation-competent (p24⁺) reservoir did not contain inversion and hypermutation, and rarely presented large internal deletion (20.7%). However, 61.4% of the genomes retrieved from p24⁺ cells displayed mutations in the Ψ locus, a proportion that was significantly higher than in p24⁻ cells (6.7%, Fisher's exact test $p < 0.0001$) (Fig.5d). These defects corresponded to point mutations in the MSD site (8.5% in p24⁺), deletion of stem loop 2 (34.9% in p24⁺) or larger deletion of the Ψ locus (56.6% in p24⁺) (Fig.S2d). Since gag proteins are translated from unspliced viral mRNA⁷², Ψ or MSD defects should not preclude their expression. Surprisingly, among the 94 unique proviral sequences retrieved from p24⁺ cells, 35 lacked the initial start codon in *gag* (position 790 in HXB2), an observation also made by Cole *et al.*³⁵. In every of these sequences, we identified a second ATG located further, which likely substitutes for this deletion (Fig.S4a). Of note, 3 of these "later *gag* start" sequences had premature stop codons 9 nucleotides upstream of the original *gag* stop codon, which did not impact p24 translation.

Genetically intact proviral sequences were rare and detected in p24⁺ cells from 3 of the 6 participants and in p24⁻ cells from only 1 participant (Fig.S2b). Overall, the proportion of genetically intact proviruses was comparable between p24⁺ and p24⁻ cells (3.9% and 2.1%, respectively) (Fig.5d). Several of these intact proviruses were found in multiple copies, indicating that inducible and intact proviruses have the ability to persist through proliferation during ART (Fig.S2c), consistent with prior studies^{38, 73}.

To further compare the genetic intactness of HIV proviruses in p24⁺ and p24⁻ cells, we assessed the integrity of all 9 coding regions (*gag*, *pol*, *vif*, *vpr*, *tat*, *rev*, *vpu*, *nef*, *env*) and 2 regulatory regions (Ψ and RRE) independently (Fig.1a). In all 6 participants, the vast majority of p24⁺ cells harbored intact viral genes coding for *vif*, *vpr*, *tat*, *rev*, *vpu* and *env*, and a complete and putatively functional RRE, whereas defects in all these regions were frequently observed in p24⁻ cells (Fig.5e). The *pol*, *nef* and to a lesser extent *gag* genes, also tended to be more frequently

intact in p24+ cells. However, the majority of p24+ cells had genetic defects in the Ψ region (mean= 90.9%), a defect that was rarely observed in p24- cells (mean= 38.9%, $p= 0.031$).

We conclude that inducible and translation-competent proviruses are genetically distinct from their non-induced and/or translation-incompetent counterparts. Although viral genomes retrieved from p24+ cells are rarely intact, they show fewer defects, which are mostly located in the Ψ region.

p24+ cells with intact proviral genomes express high levels of the integrin $\alpha 4\beta 1$

We then sought to identify the phenotypic signature of cells harboring genetically intact HIV genomes. The levels of expression of PD-1, ICOS and CD45RA did not differ between cells harboring intact and potentially replication-competent proviruses and those carrying proviruses with large deletions, stop codons or Ψ defects (Fig.6a). In contrast, cells with intact HIV proviruses expressed lower levels of the immune checkpoint molecule TIGIT compared to cells harboring genomes with Ψ defects ($p= 0.018$). CD4+ T cells with intact and inducible HIV genomes expressed higher levels of HLA-DR ($p=0.033$) and lower levels of CCR7 ($p=0.025$) than cells carrying genomes with stop codons. Strikingly, the integrin subunit $\alpha 4$ (CD49d) was expressed at higher levels at the surface of CD4+ T cells harboring intact HIV genomes compared to cells carrying genomes with any genetic defect ($p<0.01$ for all categories). The integrin $\beta 1$ (CD29), which combines with $\alpha 4$ to make the lymphocyte homing receptor $\alpha 4\beta 1$ (or very late antigen-4, VLA-4), was expressed at higher levels on CD4+ T cells harboring intact HIV genomes when compared to cells carrying genomes with large deletions ($p=0.0007$). More importantly, all cells harboring intact proviruses co-expressed high levels of $\alpha 4\beta 1$ (VLA-4), whereas only 39.7% of cells with large deletions did so (Fig.S4b).

In an attempt to identify common phenotypic features of HIV reservoir cells harboring genetically intact HIV genomes, we analyzed the phenotype of each p24+ cell individually ($n=12$) (Fig.6b). All cells with intact and inducible HIV genomes displayed a memory phenotype (33% T_{CM} and 67% T_{EM} cells). A minority of the cells harboring genetically intact genomes expressed ICOS, TIGIT or HLA-DR (8%, 8% and 25%, respectively), whereas PD-1 was more frequently expressed

(42%). Strikingly, the vast majority (92%) of cells with intact genomes expressed $\alpha 4$ and $\beta 1$, independently of their memory phenotype. Taken together, our results indicate that genetically intact and inducible HIV genomes primarily persist in memory CD4⁺ T cells expressing the adhesion molecule VLA-4.

$\alpha 4\beta 1$ enriches in CD4⁺ T cells with intact and replication-competent proviruses

Having demonstrated that genetically intact and inducible HIV genomes primarily persist in memory CD4⁺ T cells expressing higher levels of the integrin dimer $\alpha 4\beta 1$, we sought to determine if this marker identifies cells harboring replication-competent HIV. We cell-sorted memory CD4⁺ T cells expressing VLA-4 (VLA-4⁺) or not (VLA-4⁻) from 9 virally suppressed PLWH (Fig.S5a). On average, VLA-4 was expressed by 23.7% CD4⁺ T cells and 36.6% memory CD4⁺ T cells (Fig.S5b). Compared to all CD4⁺ T cells, VLA-4⁺ cells were enriched in memory CD4⁺ T cells (both T_{CM} and T_{EM}), expressed immune checkpoint molecules more frequently (PD-1, TIGIT), and expressed similar levels of immune activation markers (ICOS and HLA-DR) (Fig.S5c). We first measured the frequency of cells harboring integrated HIV DNA in sorted memory CD4⁺ T cells expressing VLA-4 or not. Memory CD4⁺ T cells expressing VLA-4 harbored slightly higher levels of integrated HIV DNA when compared to their VLA-4⁻ counterparts (median of 936 and 820 copies/10⁶ cells, respectively, $p = 0.027$) (Fig.6c). We then measured the frequency of cells with replication-competent HIV using a modified quantitative viral outgrowth assay⁷⁴. Large numbers of memory CD4⁺T cells expressing VLA-4 or not (median of 6.2 x 10⁶ and 6.7 x 10⁶ cells, respectively) were cell-sorted from 6 virally suppressed PLWH, plated in limiting dilution, stimulated with CD3/CD28 antibodies and cultured for 3 weeks. In samples from all 6 participants, memory VLA-4⁺ cells harbored significantly higher frequencies of cells with replication-competent HIV than their VLA-4⁻ counterparts (mean of 3.24 IUPM and 0.12 IUPM, respectively, $p=0.031$) (Fig.6d). Of note, in samples from 4 of the 6 participants, replication-competent HIV was exclusively retrieved from memory VLA-4⁺ cells and not from VLA-4⁻ cells.

Altogether, these results indicate that VLA-4 expression not only identifies cells with intact inducible and translation-competent persistent proviruses but also cells carrying replication-competent HIV.

Discussion

Single HIV genome approaches have provided extremely valuable information on the chromosomal location of proviral integration sites^{8, 21, 24, 34, 35, 36, 37, 68, 75}, on the T cell receptor repertoire and antigen specificity of HIV-infected cells^{31, 33, 34, 35, 76} as well as on the integrity and clonality of viral genomes^{8, 25, 26, 29, 30, 36, 37, 49, 59, 62, 68}. Nonetheless, these studies did not report on the phenotype of the cells that carry HIV proviruses and particularly those with genetically intact genomes. In this study, we developed an approach to analyze concomitantly the viral genotype and cellular phenotype of cells carrying inducible and translation-competent HIV genomes.

Our approach relies on the combination of single-cell sorting of p24+ cells followed by near full-length HIV genome amplification. NFL genome sequencing approaches using long-distance PCRs have been suspected to underestimate the intact reservoir, since amplification of short, deleted proviruses may be favored over putatively intact 9kb genomes^{77, 78}. Using single cells, we precisely measured the efficiency of our optimized method, which was consistently greater than 70%. This approach is, to our knowledge, the only one allowing association between the genetic integrity of inducible HIV genomes and the phenotype of the cells in which it persists.

Using this optimized approach, we observed a significantly higher proportion of clonally expanded genomes in p24+ cells compared to the pool of cells harboring non-induced and/or translation-incompetent proviruses (79% versus 50%, respectively). Although the proportion of clonally expanded genomes is likely underestimated in both populations due to the limited sampling, similar numbers of proviruses were analyzed in each compartment (308 and 326 genomes from p24+ and p24- cells, respectively), making unlikely that this observation results from a sampling bias. While it is now well-established that common antigens such CMV, influenza virus, EBV and *Mycobacterium tuberculosis* can induce proliferation of infected T cell clones^{28, 31, 34, 35}, the higher clonality of infected cells with inducible and translation-competent proviruses is intriguing. It is possible that intact genomes provide the infected cells with a selective advantage to escape immune-mediated killing during proliferation. In support of this model, it was recently shown that functional Nef plays a role in the persistence of genetically intact HIV⁴⁴ and that Nef-specific CD8+ T cells are associated with the frequencies of infected cells⁷⁹. Alternatively, the higher clonality of the inducible and translation-competent viral reservoir may reflect the lower

inducibility of HIV genomes in T_{CM} cells, a subset previously shown to be more refractory to reactivation⁸⁰ and which is characterized by a greater clonotypic diversity⁷⁶.

A striking observation was the extensive phenotypic diversity of CD4+ T cells harboring the exact same HIV genome, indicating that clonally expanded infected cells can display very different phenotypes. This observation is in line with the recent work by Weymar *et al.*⁸¹ demonstrating that cells harboring clonally expanded intact genomes display diverse gene expression profiles. These findings suggest that infected CD4+ T cells undergoing clonal expansions can acquire or lose specific cell surface markers and that this process likely contributes to the phenotypic diversification of the reservoir. Cho *et al.* recently reported a concomitant increase in the clonality and a decrease in the proviral diversity of the viral reservoir with time on ART²⁹. Our results add another layer of information to these observations, since they suggest that although the genetic complexity of the proviruses decreases with time on suppressive ART, their phenotypic diversity is likely to increase, a hypothesis that could be formally tested in a longitudinal study.

By comparing the viral integrity landscape of the inducible and translation-competent reservoir with its p24- counterpart, we observed that cells expressing viral capsid upon stimulation harbor longer, less deleted proviruses. However, genetically intact genomes were equally rare in both populations (<4%), and translation-competent proviruses often presented defects in the Ψ region or lacked the initial start codon in *gag*, as recently observed by Cole *et al.*³⁵. Interestingly, neither of these defects interfere with the transcription and translation of the *gag* unspliced mRNA, and cells carrying these HIV genomes retained the capacity to express the viral capsid. Whether these Ψ locus aberrations could abrogate splicing or transcription of other HIV genes would require further investigations and a better understanding of the functional plasticity of this key region^{26, 29, 82}. In addition, the high proportion of Ψ locus defects in translation-competent genomes (61%) suggests that these may be positively selected during ART through a mechanism that remains to be identified.

By analyzing the phenotype of cells harboring intact and inducible viral genomes, we confirmed that both central and effector memory cells contribute to the persistence of HIV during ART^{18, 25, 44, 50}. Among the 8 cellular markers we analyzed, the integrins $\alpha 4$ and $\beta 1$ were expressed

at higher levels on the surface of CD4+ T cells harboring intact, inducible and translation-competent genomes compared to cells carrying various genetic defects. However, as reported by others^{27, 35}, p24+ cells were surprisingly not enriched in intact proviruses, which limited the number of intact genomes we could analyze. To overcome this limiting step, we sought to validate our intriguing phenotypic finding using QVOA, the gold standard assay to measure the inducible and replication-competent HIV reservoir. This complementary approach demonstrated a 27-fold enrichment in replication-competent HIV in CD4+ T cells expressing $\alpha 4\beta 1$ compared to their negative counterparts. Importantly, $\alpha 4\beta 1$ expression enriched for intact and replication-competent proviruses in all samples tested and may represent an interesting addition to previously described flow cytometry panels aimed at isolating HIV-infected cells⁸³. The combination of $\alpha 4$ and $\beta 1$ integrins, also known as the adhesion molecule VLA-4, is involved in trafficking of immune cells to inflammatory sites as well as in T cell co-stimulation⁸⁴. It was recently demonstrated that expression of VLA-4 on resting CD4+ T cells favors their susceptibility to HIV infection *in vitro*⁸⁵ suggesting that VLA-4 may contribute to the reseeding of the reservoir by promoting the migration of resting CD4+ T cells to inflammatory tissues and facilitating their *de novo* infection during ART^{86, 87}. Although this model is attractive, results from many studies strongly suggest that reservoir replenishment is limited during ART and that the bulk of latently infected cells is established around the time of ART initiation⁸⁸. In this context, the selective advantage that VLA-4 may confer to CD4+ T cells harboring intact and inducible genomes remains elusive. VLA-4 interaction with its ligand VCAM-1 can be blocked by the monoclonal antibody natalizumab, which is used to treat multiple sclerosis but has been associated with the development of progressive multifocal leukoencephalopathy (PML)⁸⁹. Although natalizumab is unlikely to be a safe therapeutic option to target HIV reservoir cells in humans, novel generations of VLA-4 antagonists such as the recently approved $\alpha 4$ antagonist carotegrast methyl⁹⁰ could be tested in animal models.

In conclusion, our results indicate that clonal expansions in the reservoir lead to the phenotypic diversification of the cells harboring HIV genomes. Despite this diversity, the expression of VLA-4 appears to be maintained, suggesting that this adhesion molecule facilitates

the persistence of latently infected cells harboring intact and replication-competent proviruses. Future studies will be needed to unravel the mechanism by which VLA-4 exerts this effect.

Methods

Study design

The study was approved by the McGill University Health Centre and the Centre Hospitalier de l'Université de Montréal review boards. All participants were adults and signed informed consent forms. All participants were male living with HIV under suppressive ART. They underwent leukapheresis to collect large numbers of PBMCs. Participant's characteristics are summarized in Table 1. PBMCs were isolated by Ficoll density gradient centrifugation and were cryopreserved in liquid nitrogen. CD4+ T cells were enriched by negative magnetic selection using the EasySep Human CD4 T Cell Enrichment Kit (StemCell Technology, 19052).

HIV reservoir quantifications

Total HIV DNA (LTR/*gag*) and integrated HIV DNA (LTR/Alu) levels in CD4+ T cells were measured by real-time nested qPCR, as previously described⁹¹. Quantifications were performed in triplicates. Results were calculated based on a serial dilution of ACH-2 cells and expressed as HIV copies per million cells. Study participants were selected based on the frequency of p24+ cells measured by HIV-Flow (median 8 p24+ cells per million CD4+ T cells).

HIV-Flow staining

Enriched CD4+ T cells were processed for HIV-Flow assay⁵⁰. Briefly, after 1 h pre-incubation with 5 µg/ml Brefeldin A (BFA) and 24 h stimulation with 162 nM PMA and 1 µg/ml ionomycin in the presence of ARVs (200 nM lamivudine and 200 nM raltegravir), extracellular staining was performed using the following antibodies: Live/Dead Aqua Cell Stain (ThermoFisher Scientific cat.L34957), CD45RA APC-H7 (clone HI100; BD cat.560674), CCR7 BB700 (clone 3D12; BD cat.566437), PD-1 BV605 (clone EH12.2H7; Biolegend cat.329924), TIGIT eF450 (clone MBSA43; eBioscience cat.48-9500-42), HLA-DR AlexaFluor700 (clone G46-6; BD cat.560743), ICOS BV785 (clone C398.4A; Biolegend cat.313534), α4/CD49d PE-Cy7 (clone 9F10; Biolegend cat.304313) and β1/CD29 BB515 (clone MAR4; BD cat.564565). Cells were simultaneously fixed and permeabilized with the FoxP3 Buffer Set (eBioscience), followed by intracellular staining of HIV p24 with clone 28B7 APC (MediMabs cat.MM-0289-APC) and clone KC57 PE (Beckman Coulter cat.6604667). All

samples were resuspended at a final concentration of 1×10^6 cells/ml in PBS and filtered prior to cell sorting.

Cell sorting of p24- and p24+ cells

Viable p24 simple positive cells (28B7⁺ or KC57⁺ only) and double negative (28B7⁻KC57⁻) were bulk sorted prior to single-cell sorting (BD FACS ARIA III). 0.25 to 1 million p24- cells were sorted and resuspended in 100 μ L of DirectPCR Lysis Reagent (Viagen Biotech cat.301-C) containing 0.4 mg/mL Proteinase K (Wisent cat.25530–015). Cells were incubated at 55°C for 16 h for cell lysis followed by 15 min at 85°C to inactivate proteinase K. Lysates were kept at -20°C until NFL amplification. Viable p24 double positive cells (28B7⁺KC57⁺) were index single-cell sorted (BD FACS ARIA III) in 12-wells PCR strips (Fisher cat.AB1114) containing 8 μ L of DirectPCR Lysis Reagent (Viagen Biotech cat.301-C) and 0.4 mg/mL Proteinase K (Wisent cat.25530–015). The ACH-2 cell line (NIH HIV Reagent Program cat. ARP-349) was single-sorted to obtain positive control cells. Strips were incubated at 55°C for 1 h for cell lysis followed by 15 min at 85°C to inactivate proteinase K. Index-sorting data of p24+ cells were analyzed using FlowJo version 10.5.3, using the indexed sorting script (https://flowjo.typepad.com/the_daily_dongle/2016/12/how-to-use-flowjos-script-editor-with-index-sorted-data.html). To compare the phenotype of single-sorted cells from different participants and from multiple sorts, we calculated the ratio between the fluorescence intensity (FI) of each fluorochrome on a given cell by the mean fluorescence intensity (MFI) of all CD4+ T cells from the same participant.

Single-amplicon NFL nested PCR amplification

This single-amplicon near full-length HIV nested PCR is derived from previous assays^{25, 62}. For bulk sorted cells, lysates were first diluted to reach a concentration of 1.5 to 3 copies of integrated HIV DNA per well, and 12 PCR reactions of each dilution were performed to determine the proper dilution to achieve 33% of positive wells. For single-sorted cells, PCR mix was added to each well immediately after lysis. HIV proviruses were pre-amplified in a 25-cycles 3-steps PCR reaction in a total volume of 40 μ L containing Invitrogen Platinum SuperFi II MasterMix (ThermoFisher cat.12358050) with 0.2 μ M of each primer (638F: 5'-

GCGCCCGAACAGGGACYTGAAARCGAAAG-3'; BLOuterR: 5'-TGAGGGATCTCTAGTTACCAGAGTC-3'). 5 µL of each 4X diluted pre-amplification product were used in a second round of amplification, using inner primers (263F: 5'-GACCTGAAAGCGAAAGGGAAAC-3'; 280R: 5'CTAGTTACCAGAGTCACACAACAGACG-3') for 30 cycles in a 30 µL final volume reaction. ACH-2 single-sorted cell and diluted extracted DNA were used as positive controls for sorting and PCR amplification. Positive reactions were determined by visualization of amplicons on a 0.8% agarose gel.

PacBio sequencing

All amplicons were sequenced using the PacBio next-generation sequencing platform. Each HIV pre-amplified DNA were re-amplified with barcoded inner PCR primers (96 different PacBio barcodes). Barcoded amplicons were purified using AMPure XP beads (Beckman Coulter cat.A63881), following manufacturer's instructions, prior to Nanodrop quantification. 50 ng of each of the 96-barcoded amplicons were pooled together and sequenced on a Sequel or Sequel II instrument (G enome Qu ebec, Canada; DNA Link, South Korea).

PacBio demultiplex and cleaning

PacBio demultiplexing procedure was previously described²⁷. The demultiplex barcodes analysis was powered by the Lima PacBio software v2.0.0. High-quality phased consensus sequences representing near full HIV-1 genome sequences with high fidelity and without reconstruction were generated with the LAA PacBio algorithm v2.4.2. Any sequences that did not blast with HIV, that blasted with ACH-2 positive control, or that lacked one of the primer sequences were discarded from further analysis. A minimum of 10 reads per sequence were used as a coverage threshold.

Integrity analysis

All proviral sequences were aligned to the reference HXB2 sequence using Multiple Fast Fourier transform algorithm (MAFFT) with strategy E-INS-i and a scoring matrix of 1PAM/k=2 (online <https://mafft.cbrc.jp/alignment/server/> or with Geneious Prime (v2021.1.1) plugging). For integrity analysis, all sequences containing (in this order) inversions, hypermutations, large internal deletions, stop codons and/or frameshift, defects in the Ψ locus or small internal

deletions in a coding region, were considered defective. Inversions were detected manually at the alignment step, since only the reverse complement of inversions can be aligned with HXB2. Hypermutations were detected using the online HIV Database QC Tool (<https://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/QC/index.html>). Genomes with large internal deletions were defined as any provirus shorter than 8.800 bp (excluding the primer's regions). Stop codons/frameshifts and small internal deletions (>5% of ORF expected length) were identified using both the HIV Database Gene Cutter online tool (https://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/GENE_CUTTER/cutter.html) and Proseq IT (https://psd.cancer.gov/tools/pvs_annot.php). Any defect in the Ψ locus (MSD point mutation; stem loop 2 deletion; packaging signal deletion) were determined using the Proseq IT tool, and manually confirmed by looking at the alignment with the reference HXB2 sequence. The intactness 9 coding regions (*gag*, *pol*, *vif*, *vpr*, *tat*, *rev*, *vpu*, *nef*, *env*) and 2 regulatory regions (Ψ and RRE) were evaluated by assessing the presence of a start codon (except for *pol*), and the lack of internal stop codons, frameshift or deletion over 5% of the ORF's length.

Clonality analysis

Clonal sequences were defined as proviral amplicons 100% identical to each other, and were determined using the HIV Database Elim Dupes online tool (<https://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/elimdupesv2/elimdupes.html>), and confirmed using the Geneious Prime diversity tool. Phylogenetic trees were built with IQ-Tree2, using a Maximum-likelihood tree GTR+I+G model, 1,000 bootstraps.

Modified quantitative Viral Outgrowth Assay (mQVOA) in sorted VLA-4 population

CD4⁺ T cells were obtained by negative magnetic selection from 300x10⁶ PBMCs and stained with the following antibodies: Live/Dead Aqua Cell Stain (ThermoFisher Scientific cat.L34957), CD8 PB (clone RPA-T8; BD cat.558207), CD14 V450 (clone MΦP9; BD cat.560349), CD45RA APC-H7 (clone HI100; BD cat.560674), α 4/CD49d PE-Cy7 (clone 9F10; Biolegend cat.304313) and β 1/CD29 BB515 (clone MAR4; BD cat.564565). Viable memory CD4⁺ T cells expressing VLA-4 (CD8⁻/CD14⁻ CD45RA⁻ α 4^{high} β 1^{high}) or not (CD8⁻/CD14⁻ CD45RA⁻ α 4^{low/-} β 1^{low/-}) were sorted in 5 mL FACS tubes. Cells were rested for 2 h at a final concentration of 1.5 million

per mL, prior to serial dilution in culture plates (Costar) coated with 2.5 µg/ml anti-CD3 (clone OKT3) and 1 µg/ml anti-CD28 (clone CD28.2) antibodies as described elsewhere⁵⁰. MOLT-4 CCR5+ target cells (NIH HIV Reagent Program cat. ARP-4984) were added 2 days post-sort at a final concentration of 0.5x10⁶ cells/mL and the culture was maintained for 21-days. Supernatants were collected at day 7, 11, 14, 18 and 21 for soluble HIV-p24 protein quantification by ELISA⁹². Infectious units per million of cells (IUPM) were determined for each population based on the number of positive wells for soluble p24 protein (<http://silicianolab.johnshopkins.edu/>)⁹³.

Statistical analyses

All data were analyzed using GraphPad Prism v9.3.0. Statistical tests are indicated in the figure legends.

Data availability

The sequences reported in this manuscript are available in GenBank with the following reference codes, ON816029.1 to ON816663.1 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/popset/2306699925>).

The datasets generated in this study have been deposited as a Source Data file in the Figshare database under accession code (DOI:[10.6084/m9.figshare.21912840](https://doi.org/10.6084/m9.figshare.21912840)).

Acknowledgements

The authors are grateful to the people living with HIV who volunteered to participate in this study. We thank Josée Girouard, Mario Legault and Claude Gagné for recruitment, coordination, and clinical assistance with study participants. We thank Bonnie Hiener and Sarah Palmer for their precious help with the FLIPS assay and with the analysis pipeline. We thank the flow cytometry core at the CRCHUM, managed by Dominique Gauchat and Philippe St-Onge for cell sorting as well as the NC3 core (Olfa Debbeche). The following reagents were obtained through the NIH HIV Reagent Program, Division of AIDS, NIAID, NIH: ACH-2 Cells, ARP-349, contributed by Dr. Thomas Folks, and ARP-4984, contributed by Dr. Masanori Baba, Dr. Hiroshi Miyake, and Dr. Yuji Iizawa. This work was supported by the Canadian Institutes for Health Research (CIHR; operating grants #148540 and #451304 and the Canadian HIV Cure Enterprise

(CanCURE) Team Grant HB2 - 164064), the National Institute of Allergy and Infectious Diseases, National Institute for Drug Abuse, National Institute of Neurological Disorders and Stroke, National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases and the National Heart, Lung, and Blood Institute [NIAID/NIDA/NINDS/NIDDK/NHLBI, grant number UM1AI164560: Delaney AIDS Research Enterprise (DARE) to Cure HIV], the Réseau SIDA et maladies infectieuses du Fonds de Recherche du Québec - Santé (FRQ-S). CD is supported by a doctoral fellowship from the CIHR (#413313) and from the FRQ-S (#275429). J.-P.R is the holder of the Louis Lowenstein Chair in Hematology and Oncology, McGill University. N.C. is supported by Research Scholar Career Awards of the FRQ-S (#253292). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Author contributions

C.D. designed and performed the experiments, analyzed the data, and wrote the manuscript draft. C.R. B.R. and B.M. performed the bioinformatics analyses of the sequencing data. R.T. and J.-P.R. managed the recruitment of the participants. A.A. performed part of the experiments. M.P. and M.M. provided conceptual advice. R.F. designed and performed part experiments, provided conceptual advice. N.C. designed the experiments, analyzed the data, and wrote the manuscript draft. All authors read, edited and approved the manuscript.

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Disclaimer

The views expressed are those of the authors.

References

1. Finzi D, et al. Identification of a reservoir for HIV-1 in patients on highly active antiretroviral therapy. *Science* 278, 1295-1300 (1997).
2. Wong JK, et al. Recovery of replication-competent HIV despite prolonged suppression of plasma viremia. *Science* 278, 1291-1295 (1997).
3. Chun TW, Finzi D, Margolick J, Chadwick K, Schwartz D, Siliciano RF. In vivo fate of HIV-1-infected T cells: quantitative analysis of the transition to stable latency. *Nat Med* 1, 1284-1290 (1995).
4. Chun TW, et al. Presence of an inducible HIV-1 latent reservoir during highly active antiretroviral therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 13193-13197 (1997).
5. 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* 78, 6122-6133 (2004).
6. Lenasi T, Contreras X, Peterlin BM. Transcriptional interference antagonizes proviral gene expression to promote HIV latency. *Cell Host Microbe* 4, 123-133 (2008).
7. Jiang C, et al. Distinct viral reservoirs in individuals with spontaneous control of HIV-1. *Nature* 585, 261-267 (2020).
8. Einkauf KB, et al. Parallel analysis of transcription, integration, and sequence of single HIV-1 proviruses. *Cell*, 1-17 (2022).
9. Lassen KG, Bailey JR, Siliciano RF. Analysis of human immunodeficiency virus type 1 transcriptional elongation in resting CD4+ T cells in vivo. *J Virol* 78, 9105-9114 (2004).
10. Yukl SA, 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* 10, (2018).
11. Kulpa DA, et al. Differentiation into an Effector Memory Phenotype Potentiates HIV-1 Latency Reversal in CD4(+) T Cells. *J Virol* 93, (2019).

12. Davey RT, Jr., et al. HIV-1 and T cell dynamics after interruption of highly active antiretroviral therapy (HAART) in patients with a history of sustained viral suppression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 15109-15114 (1999).
13. Siliciano JD, et al. 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 (2003).
14. Crooks AM, et al. Precise Quantitation of the Latent HIV-1 Reservoir: Implications for Eradication Strategies. *J Infect Dis* 212, 1361-1365 (2015).
15. Bruner KM, et al. A quantitative approach for measuring the reservoir of latent HIV-1 proviruses. *Nature* 566, 120-125 (2019).
16. Peluso MJ, et al. Differential decay of intact and defective proviral DNA in HIV-1-infected individuals on suppressive antiretroviral therapy. *JCI Insight* 5, (2020).
17. Riou C, et al. 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 (2007).
18. Chomont N, et al. HIV reservoir size and persistence are driven by T cell survival and homeostatic proliferation. *Nat Med* 15, 893-900 (2009).
19. Buzon MJ, et al. HIV-1 persistence in CD4+ T cells with stem cell-like properties. *Nat Med* 20, 139-142 (2014).
20. Jaafoura S, et al. Progressive contraction of the latent HIV reservoir around a core of less-differentiated CD4(+) memory T Cells. *Nat Commun* 5, 5407 (2014).
21. Maldarelli F, et al. Specific HIV integration sites are linked to clonal expansion and persistence of infected cells. *Science* 345, 179-183 (2014).
22. Wagner TA, et al. HIV latency. Proliferation of cells with HIV integrated into cancer genes contributes to persistent infection. *Science* 345, 570-573 (2014).
23. Cohn LB, et al. HIV-1 integration landscape during latent and active infection. *Cell* 160, 420-432 (2015).

24. Coffin JM, et al. Clones of infected cells arise early in HIV-infected individuals. *JCI Insight* 4, (2019).
25. Hiener B, et al. Identification of Genetically Intact HIV-1 Proviruses in Specific CD4(+) T Cells from Effectively Treated Participants. *Cell Rep* 21, 813-822 (2017).
26. Pinzone MR, et al. Longitudinal HIV sequencing reveals reservoir expression leading to decay which is obscured by clonal expansion. *Nat Commun* 10, 728 (2019).
27. Sannier G, et al. Combined single-cell transcriptional, translational, and genomic profiling reveals HIV-1 reservoir diversity. *Cell Rep* 36, 109643 (2021).
28. Mendoza P, et al. Antigen-responsive CD4+ T cell clones contribute to the HIV-1 latent reservoir. *J Exp Med* 217, (2020).
29. Cho A, et al. Longitudinal clonal dynamics of HIV-1 latent reservoirs measured by combination quadruplex polymerase chain reaction and sequencing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 119, (2022).
30. Kuo HH, et al. Blood and Lymph Node Dissemination of Clonal Genome-Intact Human Immunodeficiency Virus 1 DNA Sequences During Suppressive Antiretroviral Therapy. *J Infect Dis* 222, 655-660 (2020).
31. Gantner P, et al. Single-cell TCR sequencing reveals phenotypically diverse clonally expanded cells harboring inducible HIV proviruses during ART. *Nat Commun* 11, 4089 (2020).
32. Wang Z, et al. Expanded cellular clones carrying replication-competent HIV-1 persist, wax, and wane. *Proc Natl Acad Sci U S A* 115, E2575-E2584 (2018).
33. Cohn LB, et al. Clonal CD4(+) T cells in the HIV-1 latent reservoir display a distinct gene profile upon reactivation. *Nat Med* 24, 604-609 (2018).
34. Simonetti FR, et al. Antigen-driven clonal selection shapes the persistence of HIV-1-infected CD4+ T cells in vivo. *J Clin Invest* 131, (2021).

35. Cole B, et al. In-depth single-cell analysis of translation-competent HIV-1 reservoirs identifies cellular sources of plasma viremia. *Nat Commun* 12, 3727 (2021).
36. Joseph KW, et al. Deep Sequencing Analysis of Individual HIV-1 Proviruses Reveals Frequent Asymmetric Long Terminal Repeats. *J Virol*, e0012222 (2022).
37. Patro SC, et al. Combined HIV-1 sequence and integration site analysis informs viral dynamics and allows reconstruction of replicating viral ancestors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 116, 25891-25899 (2019).
38. Musick A, et al. HIV Infected T Cells Can Proliferate in vivo Without Inducing Expression of the Integrated Provirus. *Front Microbiol* 10, 2204 (2019).
39. Shan L, et al. Transcriptional Reprogramming during Effector-to-Memory Transition Renders CD4(+) T Cells Permissive for Latent HIV-1 Infection. *Immunity* 47, 766-775 e763 (2017).
40. Fromentin R, Chomont N. HIV persistence in subsets of CD4+ T cells: 50 shades of reservoirs. *Semin Immunol* 51, 101438 (2021).
41. Brechley JM, et al. T-cell subsets that harbor human immunodeficiency virus (HIV) in vivo: implications for HIV pathogenesis. *J Virol* 78, 1160-1168 (2004).
42. 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* 110, E4987-4996 (2013).
43. Pierson T, et al. Characterization of chemokine receptor utilization of viruses in the latent reservoir for human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* 74, 7824-7833 (2000).
44. Duette G, et al. The HIV-1 proviral landscape reveals Nef contributes to HIV-1 persistence in effector memory CD4+ T-cells. *J Clin Invest*, (2022).
45. Fromentin R, et al. CD4+ T Cells Expressing PD-1, TIGIT and LAG-3 Contribute to HIV Persistence during ART. *PLoS Pathog* 12, e1005761 (2016).

46. McGary CS, et al. CTLA-4(+)PD-1(-) Memory CD4(+) T Cells Critically Contribute to Viral Persistence in Antiretroviral Therapy-Suppressed, SIV-Infected Rhesus Macaques. *Immunity* 47, 776-788 e775 (2017).
47. Banga R, et al. PD-1(+) and follicular helper T cells are responsible for persistent HIV-1 transcription in treated aviremic individuals. *Nat Med* 22, 754-761 (2016).
48. 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* 210, 143-156 (2013).
49. Horsburgh BA, et al. High levels of genetically intact HIV in HLA-DR+ memory T cells indicates their value for reservoir studies. *AIDS* 34, 659-668 (2020).
50. Pardons M, et al. Single-cell characterization and quantification of translation-competent viral reservoirs in treated and untreated HIV infection. *PLoS Pathog* 15, e1007619 (2019).
51. 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* 87, 9148-9158 (2013).
52. Hogan LE, et al. Increased HIV-1 transcriptional activity and infectious burden in peripheral blood and gut-associated CD4+ T cells expressing CD30. *PLoS Pathog* 14, e1006856 (2018).
53. Descours B, et al. CD32a is a marker of a CD4 T-cell HIV reservoir harbouring replication-competent proviruses. *Nature* 543, 564-567 (2017).
54. Darcis G, et al. CD32(+)CD4(+) T Cells Are Highly Enriched for HIV DNA and Can Support Transcriptional Latency. *Cell Rep* 30, 2284-2296 e2283 (2020).
55. Serra-Peinado C, et al. Expression of CD20 after viral reactivation renders HIV-reservoir cells susceptible to Rituximab. *Nat Commun* 10, 3705 (2019).
56. Dunay GA, et al. Assessment of the HIV-1 reservoir in CD4+ regulatory T cells by a Droplet Digital PCR based approach. *Virus Res* 240, 107-111 (2017).

57. Jiao YM, et al. CD4+CD25+CD127 regulatory cells play multiple roles in maintaining HIV-1 p24 production in patients on long-term treatment: HIV-1 p24-producing cells and suppression of anti-HIV immunity. *Int J Infect Dis* 37, 42-49 (2015).
58. Tran TA, et al. Resting regulatory CD4 T cells: a site of HIV persistence in patients on long-term effective antiretroviral therapy. *PLoS One* 3, e3305 (2008).
59. Lee GQ, et al. Clonal expansion of genome-intact HIV-1 in functionally polarized Th1 CD4+ T cells. *J Clin Invest* 127, 2689-2696 (2017).
60. Gosselin A, et al. HIV persists in CCR6+CD4+ T cells from colon and blood during antiretroviral therapy. *AIDS* 31, 35-48 (2017).
61. Chun TW, et al. Quantification of latent tissue reservoirs and total body viral load in HIV-1 infection. *Nature* 387, 183-188 (1997).
62. Ho YC, et al. Replication-competent noninduced proviruses in the latent reservoir increase barrier to HIV-1 cure. *Cell* 155, 540-551 (2013).
63. Bruner KM, et al. Defective proviruses rapidly accumulate during acute HIV-1 infection. *Nat Med* 22, 1043-1049 (2016).
64. 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* 113, 8783-8788 (2016).
65. Imamichi H, et al. Defective HIV-1 proviruses produce viral proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 117, 3704-3710 (2020).
66. Gaebler C, et al. Combination of quadruplex qPCR and next-generation sequencing for qualitative and quantitative analysis of the HIV-1 latent reservoir. *J Exp Med* 216, 2253-2264 (2019).
67. Cicilionyte A, Berkhout B, Pasternak AO. Assessing proviral competence: current approaches to evaluate HIV-1 persistence. *Curr Opin HIV AIDS* 16, 223-231 (2021).

68. Lian X, et al. Signatures of immune selection in intact and defective proviruses distinguish HIV-1 elite controllers. *Sci Transl Med* 13, eabl4097 (2021).
69. Einkauf KB, et al. Intact HIV-1 proviruses accumulate at distinct chromosomal positions during prolonged antiretroviral therapy. *J Clin Invest* 129, 988-998 (2019).
70. Clouse KA, et al. Monokine regulation of human immunodeficiency virus-1 expression in a chronically infected human T cell clone. *J Immunol* 142, 431-438 (1989).
71. von Stockenstrom S, et al. Longitudinal Genetic Characterization Reveals That Cell Proliferation Maintains a Persistent HIV Type 1 DNA Pool During Effective HIV Therapy. *J Infect Dis* 212, 596-607 (2015).
72. Purcell DF, Martin MA. Alternative splicing of human immunodeficiency virus type 1 mRNA modulates viral protein expression, replication, and infectivity. *J Virol* 67, 6365-6378 (1993).
73. Anderson EM, et al. Dynamic Shifts in the HIV Proviral Landscape During Long Term Combination Antiretroviral Therapy: Implications for Persistence and Control of HIV Infections. *Viruses* 12, (2020).
74. Massanella M, et al. Improved assays to measure and characterize the inducible HIV reservoir. *EBioMedicine* 36, 113-121 (2018).
75. Artesi M, et al. PCIP-seq: simultaneous sequencing of integrated viral genomes and their insertion sites with long reads. *Genome Biol* 22, 97 (2021).
76. Boritz EA, et al. Multiple Origins of Virus Persistence during Natural Control of HIV Infection. *Cell* 166, 1004-1015 (2016).
77. Gaebler C, et al. Sequence Evaluation and Comparative Analysis of Novel Assays for Intact Proviral HIV-1 DNA. *J Virol* 95, (2021).
78. White JA, et al. Measuring the latent reservoir for HIV-1: Quantification bias in near full-length genome sequencing methods. *PLoS Pathog* 18, e1010845 (2022).

79. Stevenson EM, et al. HIV-specific T cell responses reflect substantive in vivo interactions with antigen despite long-term therapy. *JCI Insight* 6, (2021).
80. Pardons M, Fromentin R, Pagliuzza A, Routy JP, Chomont N. Latency-Reversing Agents Induce Differential Responses in Distinct Memory CD4 T Cell Subsets in Individuals on Antiretroviral Therapy. *Cell Rep* 29, 2783-2795 e2785 (2019).
81. Weymar GHJ, et al. Distinct gene expression by expanded clones of quiescent memory CD4(+) T cells harboring intact latent HIV-1 proviruses. *Cell Rep* 40, 111311 (2022).
82. Das AT, Pasternak AO, Berkhout B. On the generation of the MSD- class of defective HIV proviruses. *Retrovirology* 16, 19 (2019).
83. Neidleman J, et al. Phenotypic analysis of the unstimulated in vivo HIV CD4 T cell reservoir. *Elife* 9, (2020).
84. Sato T, Tachibana K, Nojima Y, D'Avirro N, Morimoto C. Role of the VLA-4 molecule in T cell costimulation. Identification of the tyrosine phosphorylation pattern induced by the ligation of VLA-4. *J Immunol* 155, 2938-2947 (1995).
85. Card CM, Abrenica B, McKinnon LR, Ball TB, Su RC. Endothelial Cells Promote Productive HIV Infection of Resting CD4(+) T Cells by an Integrin-Mediated Cell Adhesion-Dependent Mechanism. *AIDS Res Hum Retroviruses*, (2021).
86. Lorenzo-Redondo R, et al. Persistent HIV-1 replication maintains the tissue reservoir during therapy. *Nature* 530, 51-56 (2016).
87. Fletcher CV, et al. Persistent HIV-1 replication is associated with lower antiretroviral drug concentrations in lymphatic tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111, 2307-2312 (2014).
88. Abrahams MR, et al. The replication-competent HIV-1 latent reservoir is primarily established near the time of therapy initiation. *Sci Transl Med* 11, (2019).
89. Clifford DB, De Luca A, Simpson DM, Arendt G, Giovannoni G, Nath A. Natalizumab-associated progressive multifocal leukoencephalopathy in patients with multiple sclerosis: lessons from 28 cases. *Lancet Neurol* 9, 438-446 (2010).

90. Dhillon S. Carotegrast Methyl: First Approval. *Drugs* 82, 1011-1016 (2022).
91. Vandergeeten C, et al. Cross-clade ultrasensitive PCR-based assays to measure HIV persistence in large-cohort studies. *J Virol* 88, 12385-12396 (2014).
92. 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* 76, 1004-1014 (2002).
93. 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* 2, ofv123 (2015).

Figures

Figure 1.

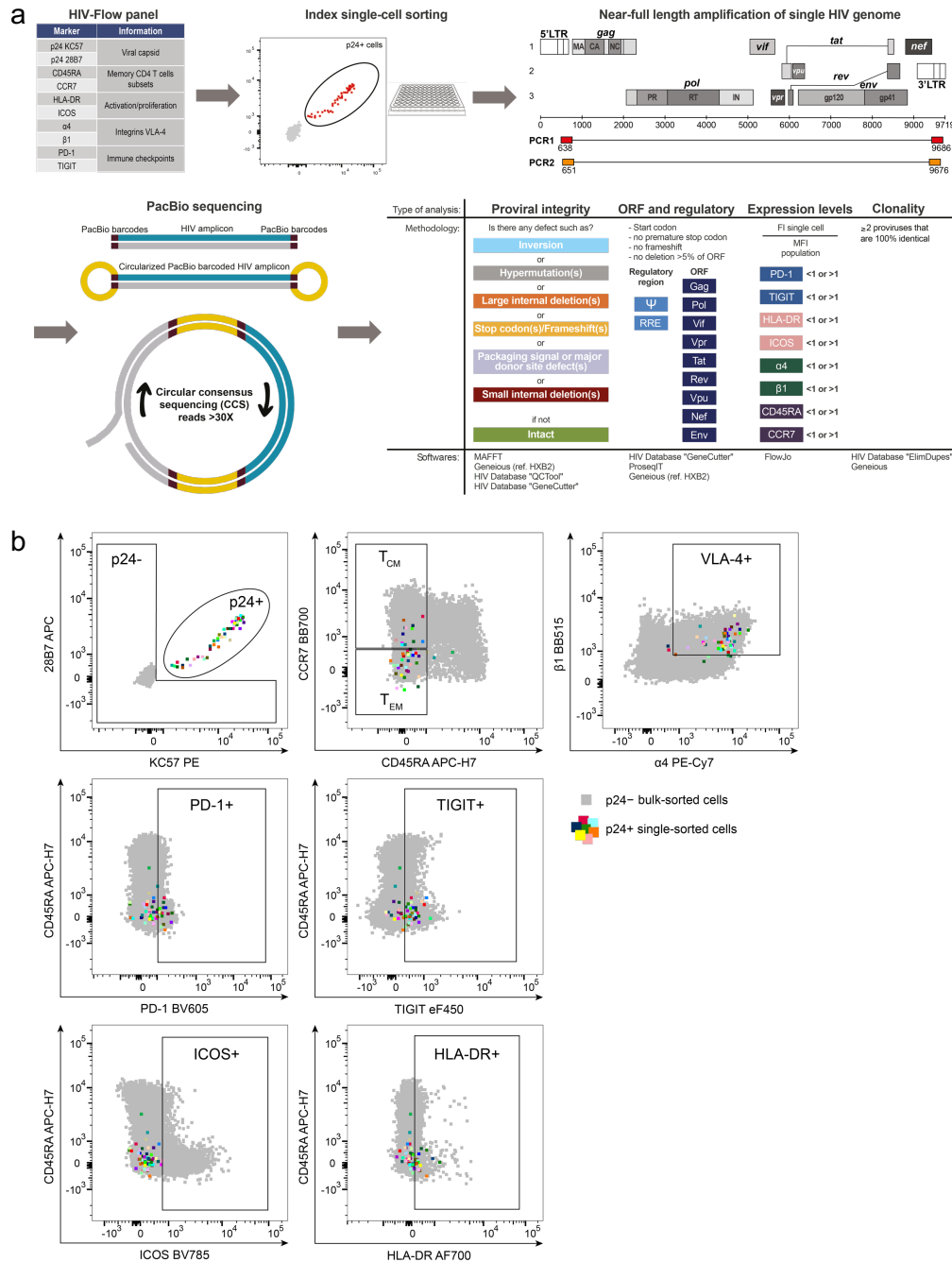


Fig.1 Near full-length genome sequencing in single p24-expressing cells. **a** Isolated CD4⁺ T cells were stimulated with PMA/ionomycin for 24h in the presence of BFA prior to extracellular and intracellular staining using antibodies specific to the cellular and viral proteins listed in the HIV-Flow panel table. Single p24⁺ cells were index-cell sorted in individual wells. NFL HIV amplification by nested PCR was performed on each single sorted p24⁺ cells, followed by PacBio next-generation sequencing. Proviruses were analyzed individually for their genetic integrity. Levels of expression of cellular markers on each individual cell was retrieved and analyzed according to the genetic integrity and clonality of the provirus from this cell. **b** Representative dot plots of an HIV-Flow staining from participant ART5. Each colored dot represents a single infected cell (p24⁺) that was index-sorted. p24⁺ cells are overlaid onto p24⁻ cells in grey.

Figure 2.

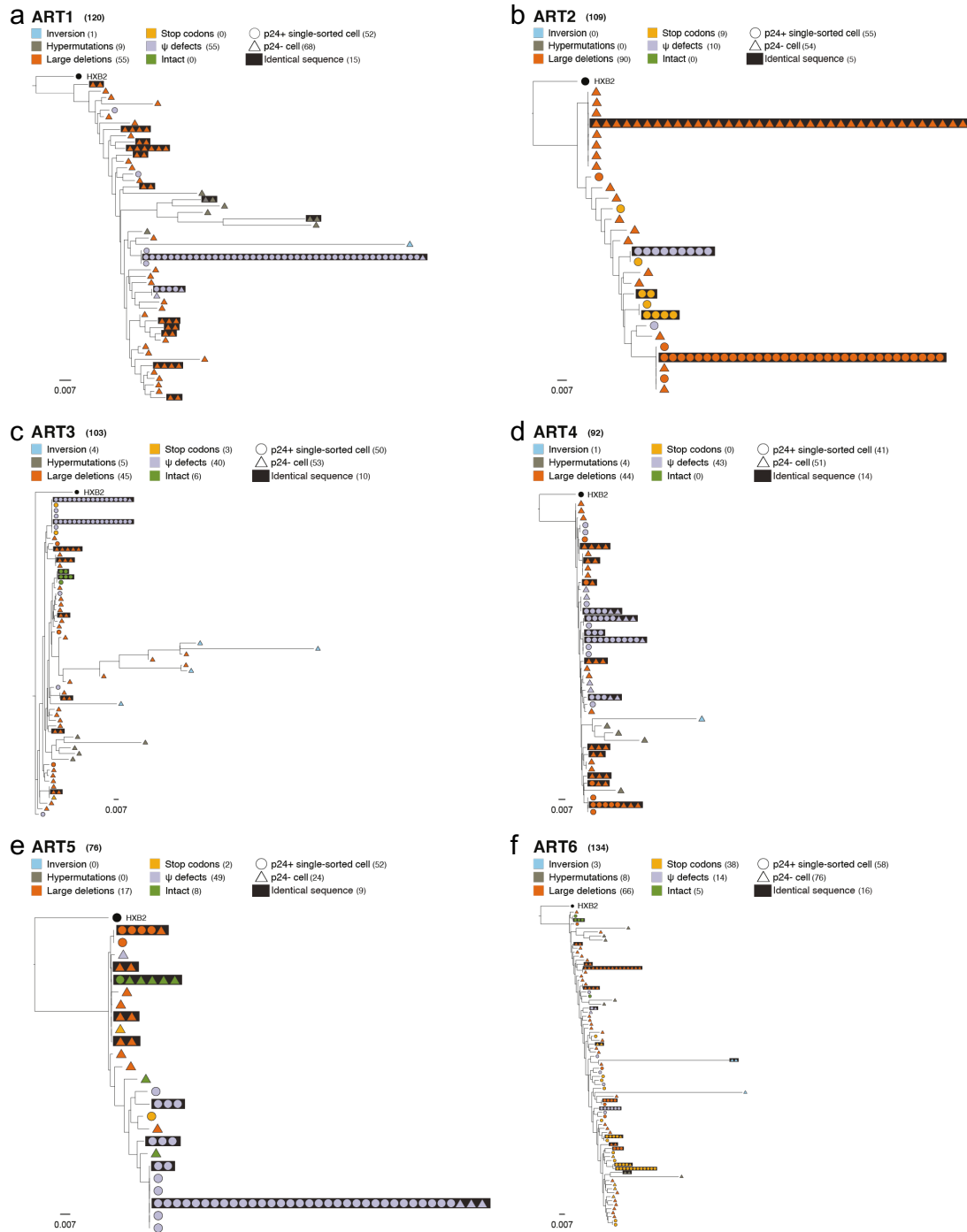


Fig.2 Phylogenetic analysis of HIV genomes in p24+ and p24- populations from 6 ART-treated participants. Maximum-likelihood phylogenetic trees of proviral genomes retrieved from p24+ cells (dot) and p24- cells (triangle) from the 6 participants: **a** ART1, **b** ART2, **c** ART3, **d** ART4, **e** ART5 and **f** ART6. Each genetic integrity/defect category is color-coded. Clonal expansions of identical proviruses are framed in black rectangles. The total number of proviruses sequenced for each participant are indicated at the top of each tree next to each category. The HXB2 sequence (black dot) was included as a reference in each tree.

Figure 3.

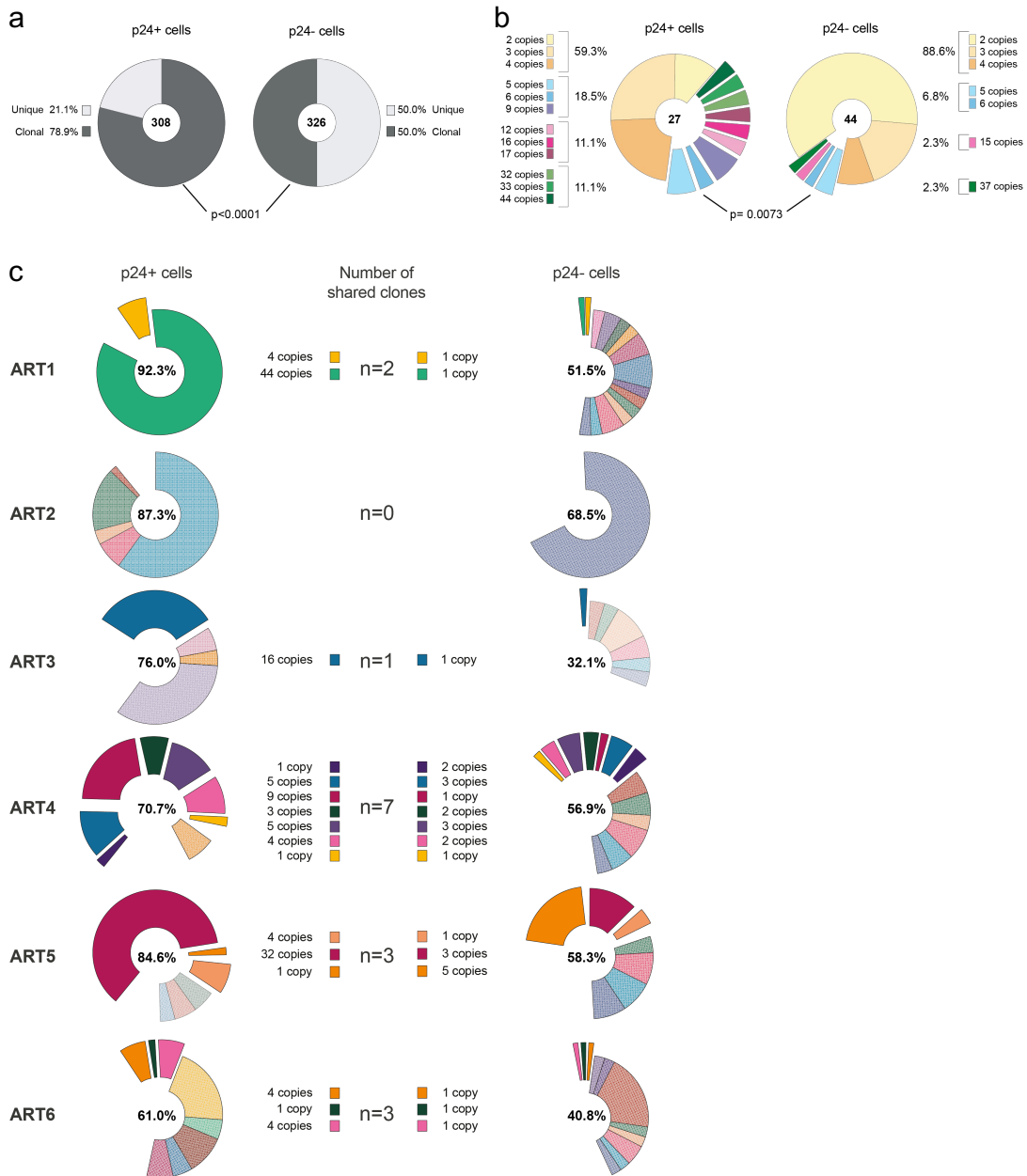


Fig.3 Clonality of the inducible and non-induced reservoirs. a Pie charts representing the proportions of unique (light grey) and clonally expanded (i.e., ≥ 2 copies, dark grey) proviruses in the p24+ and p24- populations from the 6 participants. Two-sided Fisher's exact test ($p < 0.0001$) of the contribution of clonally expanded proviral sequences to the total number of HIV genomes was performed between the two populations. The numbers of HIV genomes are indicated in each pie chart. b Distributions of clonal expansions from the 6 participants. Proportions of clones according to their size are represented for each cell population, with the total number of clonal expansions indicated in the pie charts. Difference in the contribution of clones with ≥ 5 copies (exploded from the piecharts) between p24+ and p24- cells was tested with two-sided Fisher's exact test ($p = 0.0073$). c Clonally expanded proviruses in the p24+ and p24- populations of the 6 participants. Each expansion is depicted by a different color. Shared clones between the p24+ and p24- populations are exploded from the charts and are depicted in solid colors. Contributions of clonal expansions to each population are indicated in the pie charts. The number of shared clones and their copy numbers are indicated in the middle column.

Figure 4.

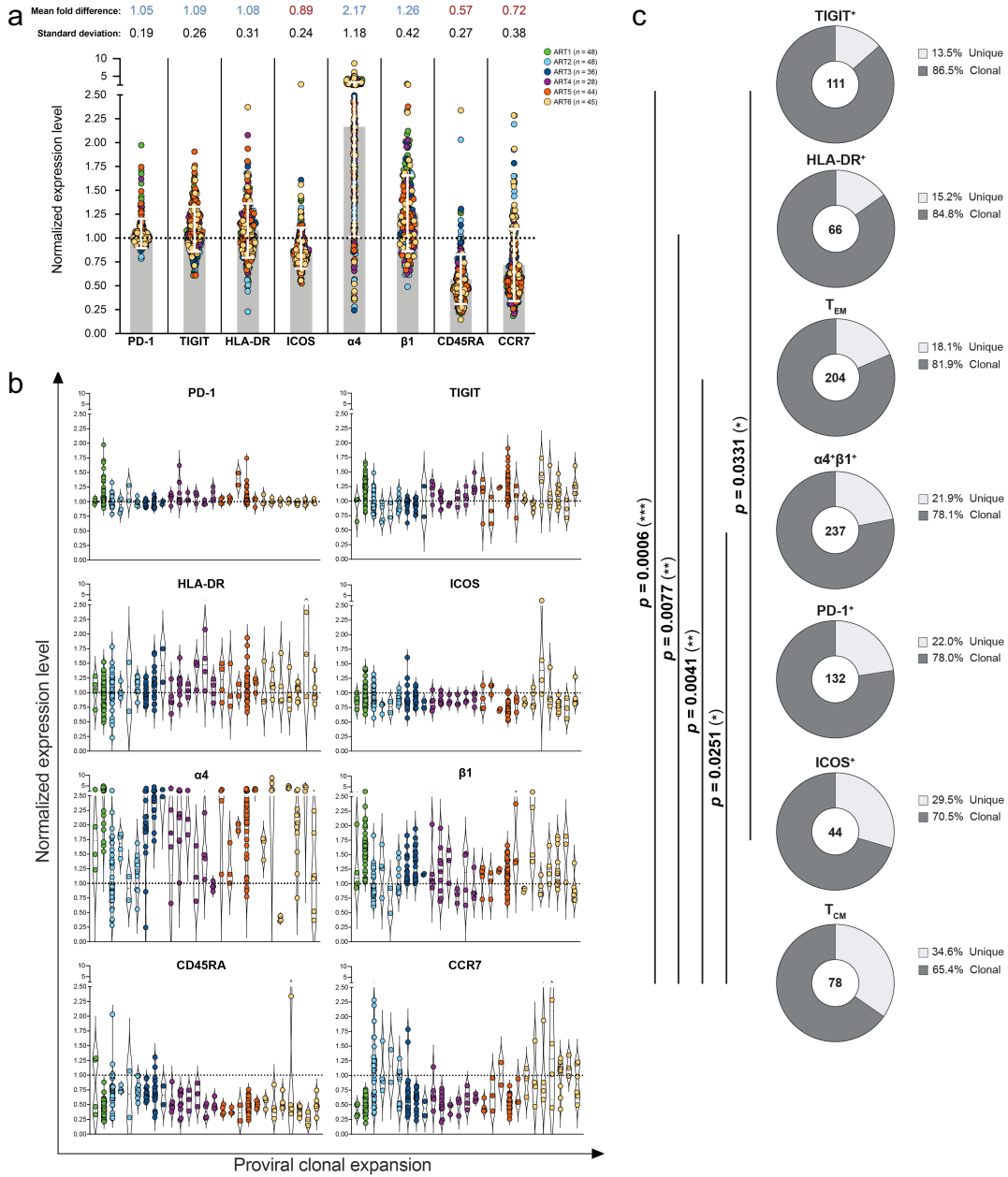


Fig.4 Phenotype of clonally expanded cells harboring inducible and translation-competent proviruses. Levels of expression of PD-1, TIGIT, HLA-DR, ICOS, $\alpha 4$, $\beta 1$, CD45RA and CCR7 is represented by the ratio between the fluorescence intensity of a cellular marker on each p24⁺ single sorted-cell and the mean fluorescence intensity of this marker on all CD4⁺ T cells from the same participant. A normalized expression level above or below 1 (dotted line) reflects a higher or lower expression of this marker on a given p24⁺ cell compared to all CD4⁺ T cells, respectively. Each dot represents a single-sorted cell and is color-coded by participant. **a** Normalized expression levels of each marker for all clonally expanded p24⁺ cells ($n = 239$ independent clonally expanded proviruses). Mean fold difference in levels of expression and standard deviations are indicated at the top of the graph. Grey bars indicate the mean normalized expression level for each marker. **b** Normalized expression levels of individual p24-expressing cells belonging to each individual clone. Single-sorted cells belonging to the same clone are grouped in each column and color-coded by participant. **c** Pie charts representing the proportions of unique (light grey) and clonally expanded (dark grey) proviral sequences expressing each marker. Numbers of proviral sequences retrieved from p24⁺ cells expressing each marker are indicated in the center of the pie chart. Differences in frequency of clonal proviruses between each subset were assessed by two-sided Chi-square t-test (*: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$).

Figure 5.

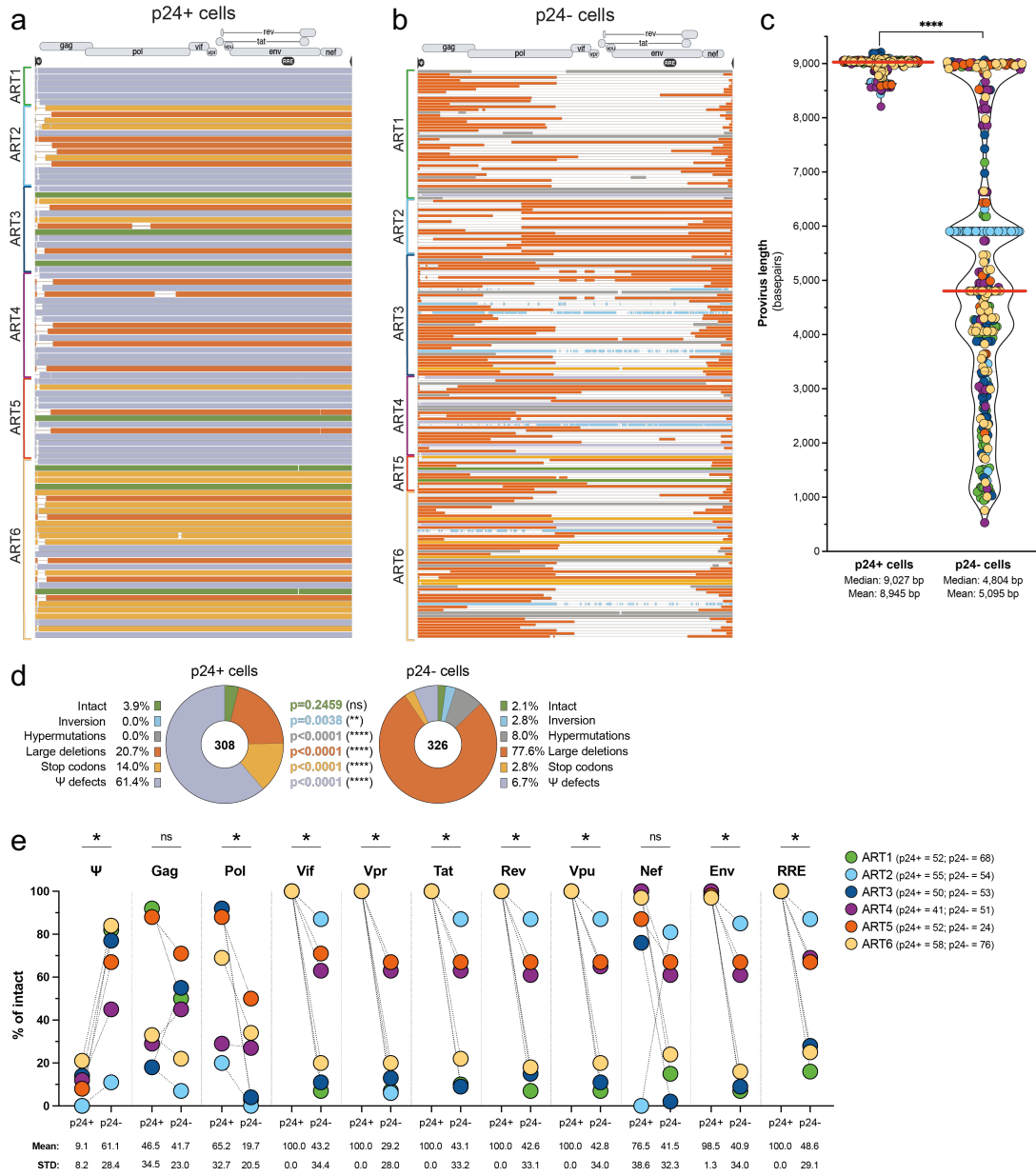


Fig.5 Near full-length proviral sequencing and integrity analysis of HIV genomes retrieved from p24+ and p24- cells. HIV genomes obtained from p24+ cells (a) and p24- cells (b) from the 6 participants were aligned to the annotated HXB2 reference sequence. Each sequence is color-coded according to its integrity category (see legend in 5d). Clonally expanded proviruses are only displayed once. c Lengths of individual HIV genomes retrieved from p24+ and p24- cells are plotted: Each dot corresponds to a proviral sequence and is color-coded by participant (see legend in 5e). The median of each violin plot is represented by a red horizontal line, and the mean and median values are indicated at the bottom of the graph. Difference in the length of HIV genomes between p24+ and p24- populations was assessed by the Kolmogorov-Smirnov test (****: $p < 0.0001$). d Proportions of proviruses displaying different types of genetic defects in p24+ and p24- cells. Numbers of proviral sequences analyzed are indicated next to the legend. Differences in the proportion of proviruses displaying different types of defects between p24+ and p24- cells were assessed by the two-sided Fisher's exact test (**: $p = 0.0038$; ****: $p < 0.0001$). e The proportions of viral genomes with intact Ψ , gag, pol, vif, vpr, tat, rev, vpu, nef env and RRE (rev responsive element) were compared between p24+ and p24- cells. Each participant is color-coded, and total number of sequences analyzed are indicated next to the legend. Means and standard deviations (STD) are indicated at the bottom of the graph. Differences in the percentage of intact between p24+ and p24- populations was assessed by the non-parametric two-tailed Wilcoxon paired t-test (*: $p = 0.0312$).

Figure 6.

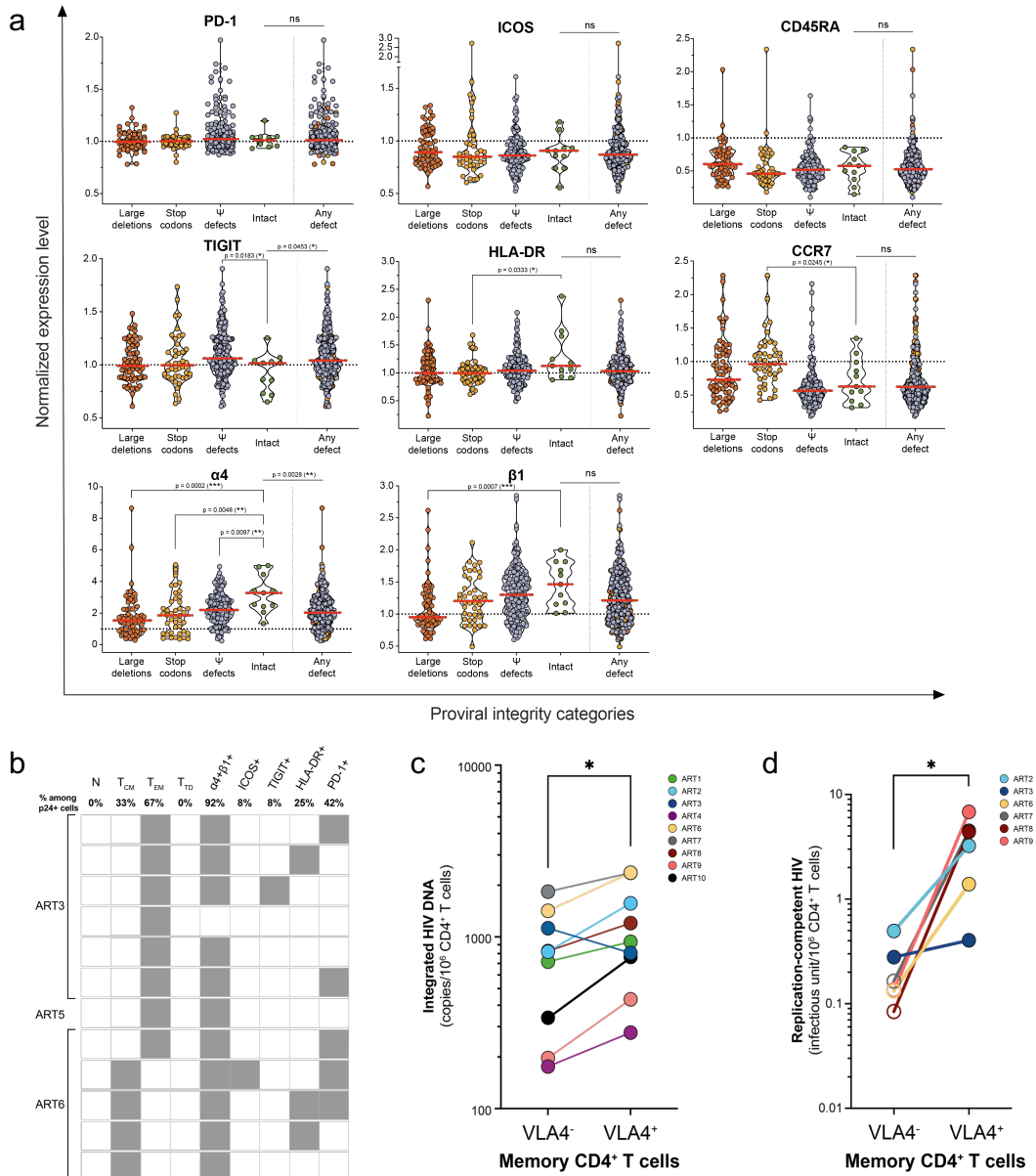


Fig.6 Phenotype of cells harboring inducible, translation- and replication-competent proviruses. **a** Normalized expression levels of PD-1, ICOS, CD45RA, TIGIT, HLA-DR, CCR7, $\alpha 4$ and $\beta 1$ on cells harboring HIV genomes with different types of genetic defects. Each dot corresponds to a single cell, and cells are grouped according to the genetic defects found in the viral genomes they carry. In each panel, the violin plot on the right includes all defective proviruses grouped together. Two-tailed Mann-Whitney unpaired nonparametric t-tests were performed to assess differences in the expression level of each marker between intact proviruses and all other categories (*: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$). In all panels, the threshold ratio of 1 is indicated by a dotted line and the medians of the violin plots are represented by red lines. **b** Phenotypic analysis of the p24+ cells harboring intact HIV genomes. Grey square denotes expression of a given marker. Frequencies of p24+ cells with intact provirus expressing each marker are indicated at the top of the table. **c** Integrated HIV DNA (copies per million CD4+ T cells) was measured in sorted memory CD4+ T cells expressing or not VLA-4 from 9 ART-treated participants. Differences were assessed by the non-parametric two-tailed Wilcoxon paired t-test (*: $p = 0.0273$). **d** Frequency of memory CD4+ T cells with replication-competent HIV was measured by QVOA in sorted cells from 6 participants expressing or not VLA-4. Differences in infectious units per million cells (IUPM) between memory CD4+ T cells expressing VLA-4 or not were assessed by the non-parametric two-tailed Wilcoxon paired t-test (*: $p = 0.0312$). Samples with undetectable IUPM values were plotted at the limit of detection of the assay (open circles).

Tables

Table 1: Cohort characteristics.

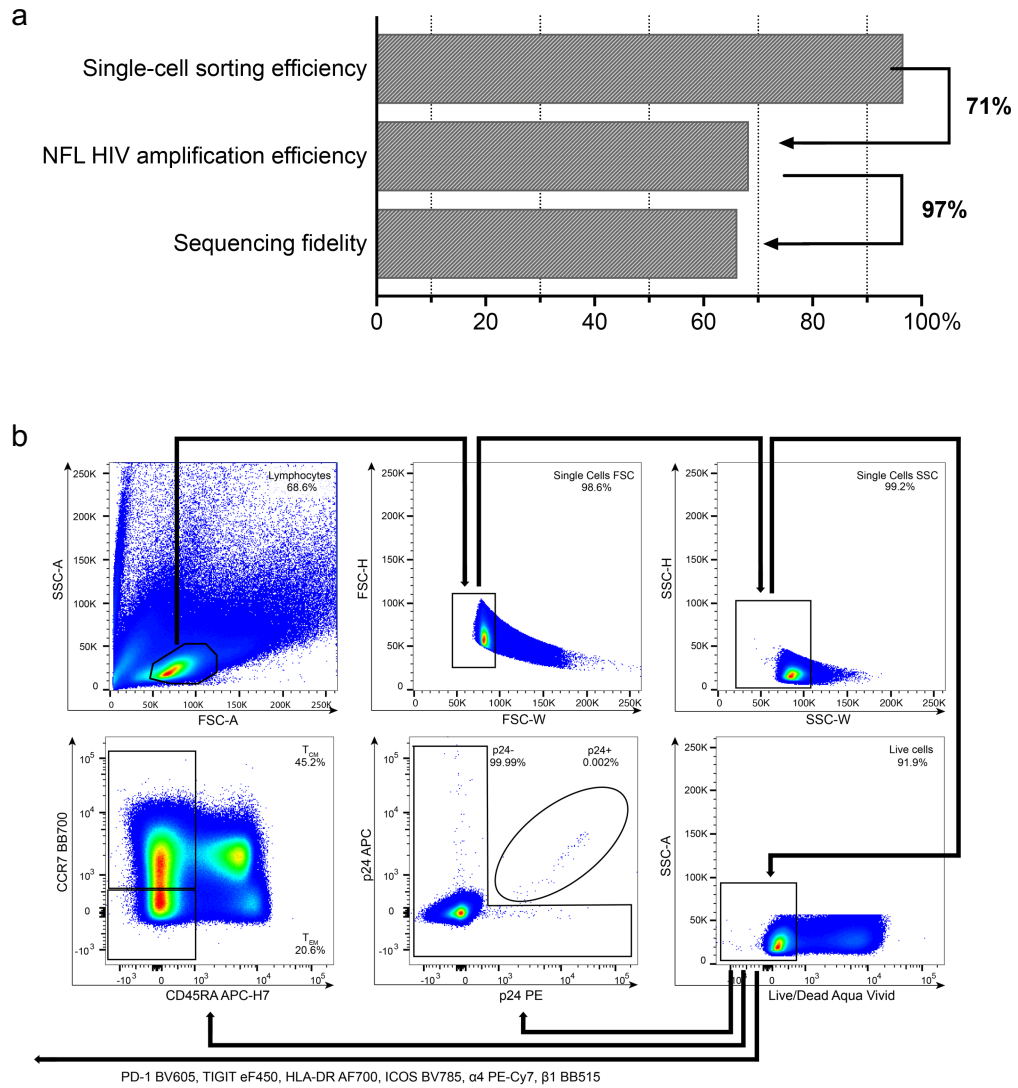
Clinical data of the 10 ART-treated participants at the time of blood collection.

| | ART1 | ART2 | ART3 | ART4 | ART5 | ART6 | ART7 | ART8 | ART9 | ART10 | Median |
|--|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|
| Characteristics of participants | | | | | | | | | | | |
| Sex | M | M | M | M | M | M | M | M | M | M | |
| Age, year-range | 50-59 | 60-69 | 60-69 | 40-49 | 30-39 | 50-59 | 50-59 | 30-39 | 60-69 | 30-39 | 53.5 |
| Time since diagnosis, years | 29 | 23 | 26 | 15 | 12 | 21 | 14 | 7 | 5 | 14 | 15 |
| Time on antiretroviral treatment, years | 14 | 17 | 21 | 14.8 | 4 | 20 | 6 | 6.5 | 4.3 | 9 | 12 |
| Time between diagnosis and ART initiation, years | 15 | 7 | 5 | 0.3 | 8 | 1 | 8 | 0.5 | 0.4 | 5 | 5 |
| HIV viral load, RNA copies per ml of plasma | <40 | <40 | <40 | <40 | <40 | <40 | <40 | <40 | <40 | <40 | <40 |
| CD4 cell count, cells per μ L | 847 | 602 | 1076 | 625 | 471 | 911 | 836 | 461 | 624 | 882 | 731 |
| CD8 cell count, cells per μ L | 613 | 880 | 558 | 511 | 322 | 873 | 1551 | 941 | 545 | 1177 | 743 |
| CD4/CD8 ratio | 1.4 | 0.7 | 1.9 | 1.2 | 1.5 | 1.0 | 0.5 | 0.5 | 1.1 | 0.8 | 1.1 |
| Integrated HIV DNA, copies per million CD4 T cells | 403 | 1404 | 442 | 438 | 146 | 1913 | 680 | 502 | 142 | 483 | 463 |
| HIV-Flow, p24+ cells per million CD4 T cells | 8 | 6 | 11 | 9 | 15 | 10 | 0 | 5 | 3 | 8 | 8 |
| Assays performed | | | | | | | | | | | |
| Single-cell sorting assay | X | X | X | X | X | X | | | | | |
| VLA-4 HIV DNA measures | X | X | X | X | | X | X | X | X | X | |
| VLA-4 QVOA | | X | X | | | X | X | X | X | | |

M: male; ART: antiretroviral therapy; QVOA: quantitative viral outgrowth assay

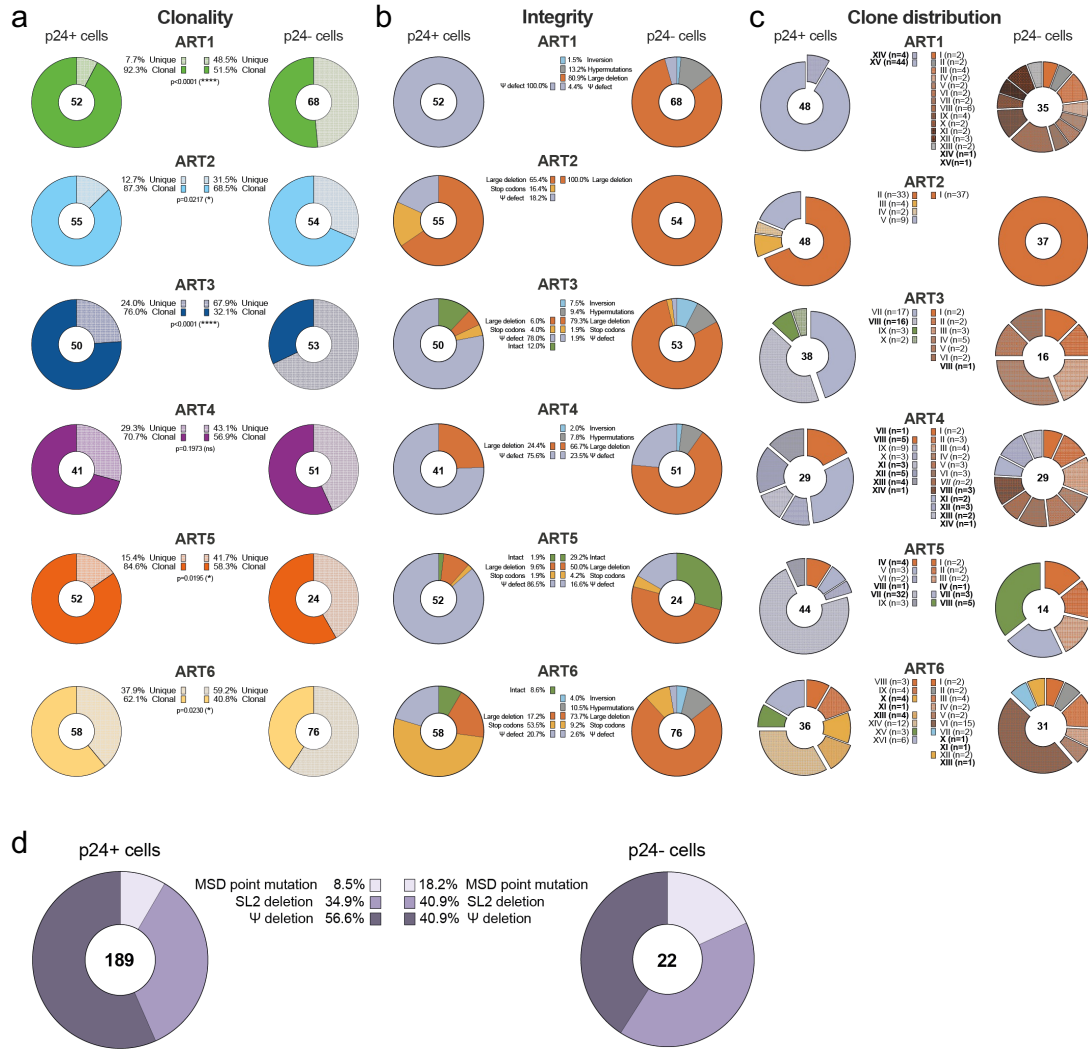
Supplementary information files

Supplementary figure 1.



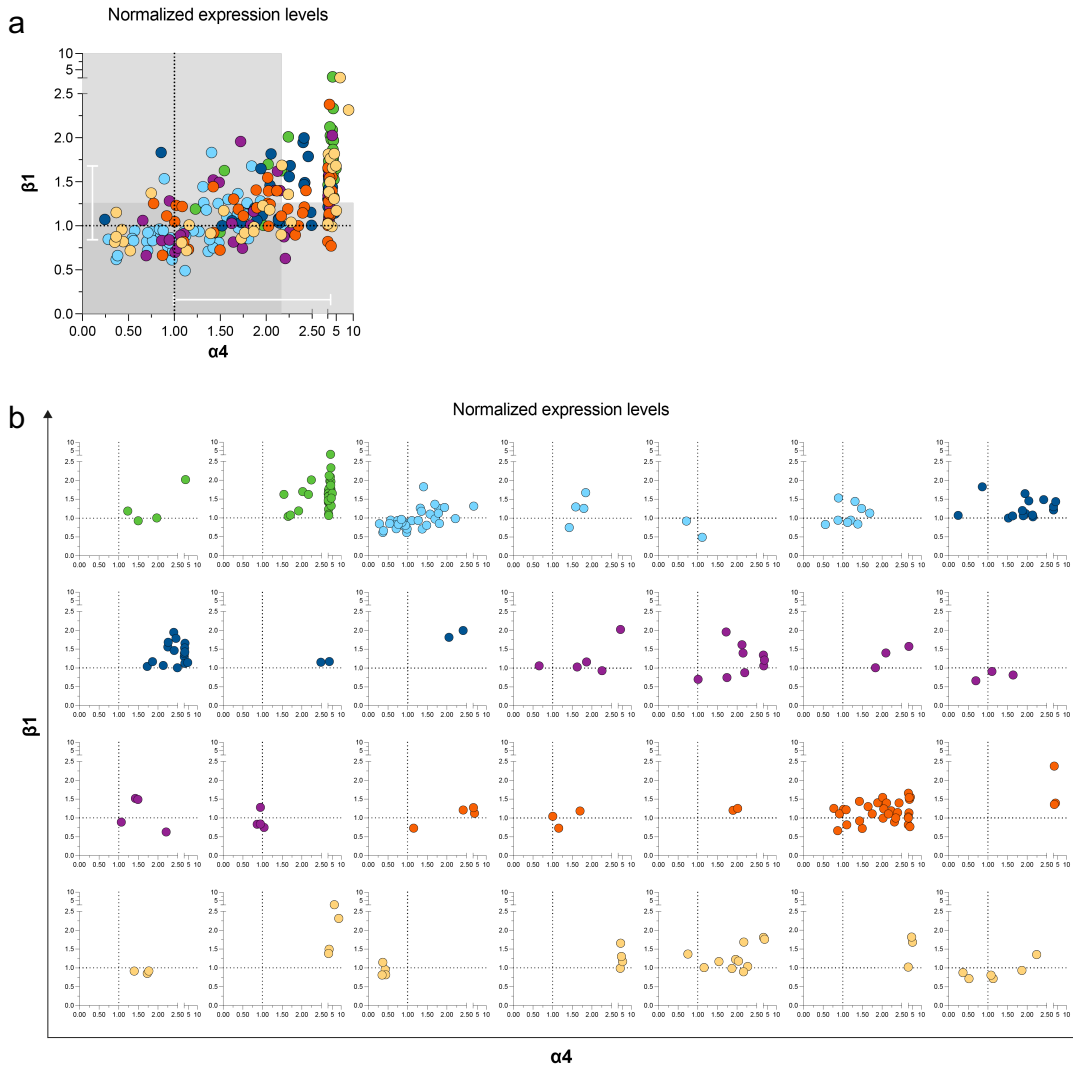
Supplementary Fig.1 Efficiency of the approach. **a** ACH-2 cells were single sorted and subjected to near full-length HIV genome amplification. Amplified products were barcoded and sent for PacBio next-generation sequencing. Single sorted ACH2 cells were retrieved from 96.7% of the wells (detectable CD3 gene by qPCR) and 70.1% of the genomes were successfully amplified. Proviral sequences from 93.0% of the amplified near full-length genomes were identical to each other and matched the MN691959.1 HIV-1 isolate ACH-2 reference (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MN691959>). The proportion of single-cell sorting efficiency, NFL HIV amplification efficiency, and sequencing fidelity are indicated. **b** Gating strategy for p24+ single-sorting cells, without indexing strategy. Dot plots from a representative participant are shown.

Supplementary figure 2.



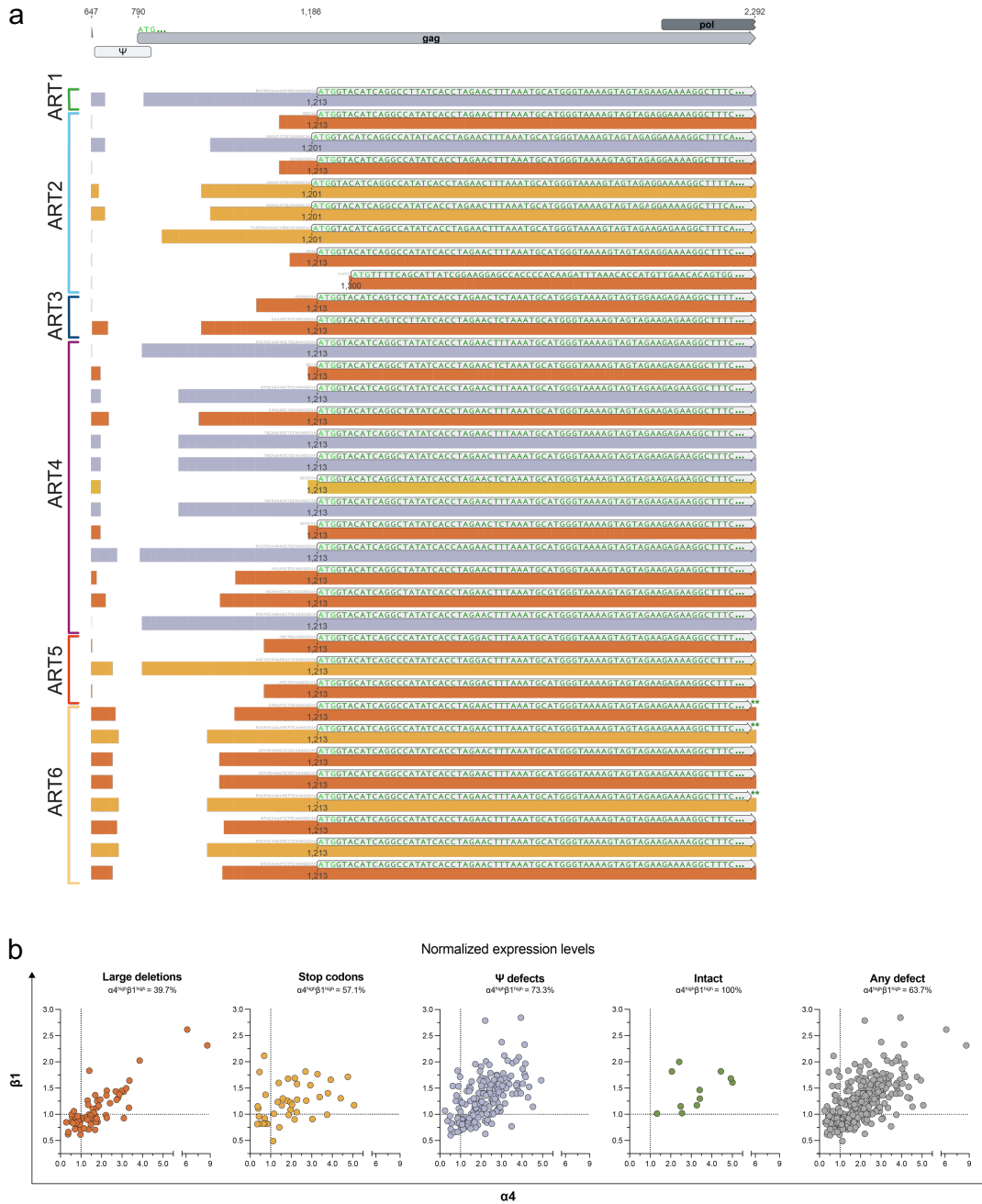
Supplementary Fig.2 Integrity and clonality of HIV genomes retrieved from p24+ and p24- cells for each participant. a Pie charts representing the proportions of unique (dotted color) and clonal (solid color) proviral sequences retrieved from p24+ and p24- cells. Percentages are indicated. The number of proviral sequences analyzed is indicated in each pie chart. For each participant, two-sided Fisher's exact test was used to determine differences in clonality between the two populations (*: $p < 0.05$; ****: $p < 0.0001$). b Pie charts representing the proportions of genomes with different types of genetic defects in p24+ and p24- cells. Genetic defects are color-coded and their percentages are indicated. The total number of proviral sequences analyzed is indicated in each pie chart. c Distribution and genetic integrity of the clonally expanded clones. Each fraction of the pie chart represents a clonal expansion and is color-coded according to the type of defect as in B. The number of individual cells belonging to each clone is indicated. The total number of clonally expanded proviral sequences analyzed is indicated in each pie chart. Clones in bold are shared between p24+ and p24- cells. d Proportions of Ψ defective proviruses with major splicing donor site point mutation (dark purple), stem loop 2 deletion (purple) and larger psi deletion (light purple) in p24+ and p24- cells. The number of proviral sequences analyzed is indicated in each pie chart. Differences in the contribution of each defect to the total population was performed using the two-sided Fisher's exact test.

Supplementary figure 3.



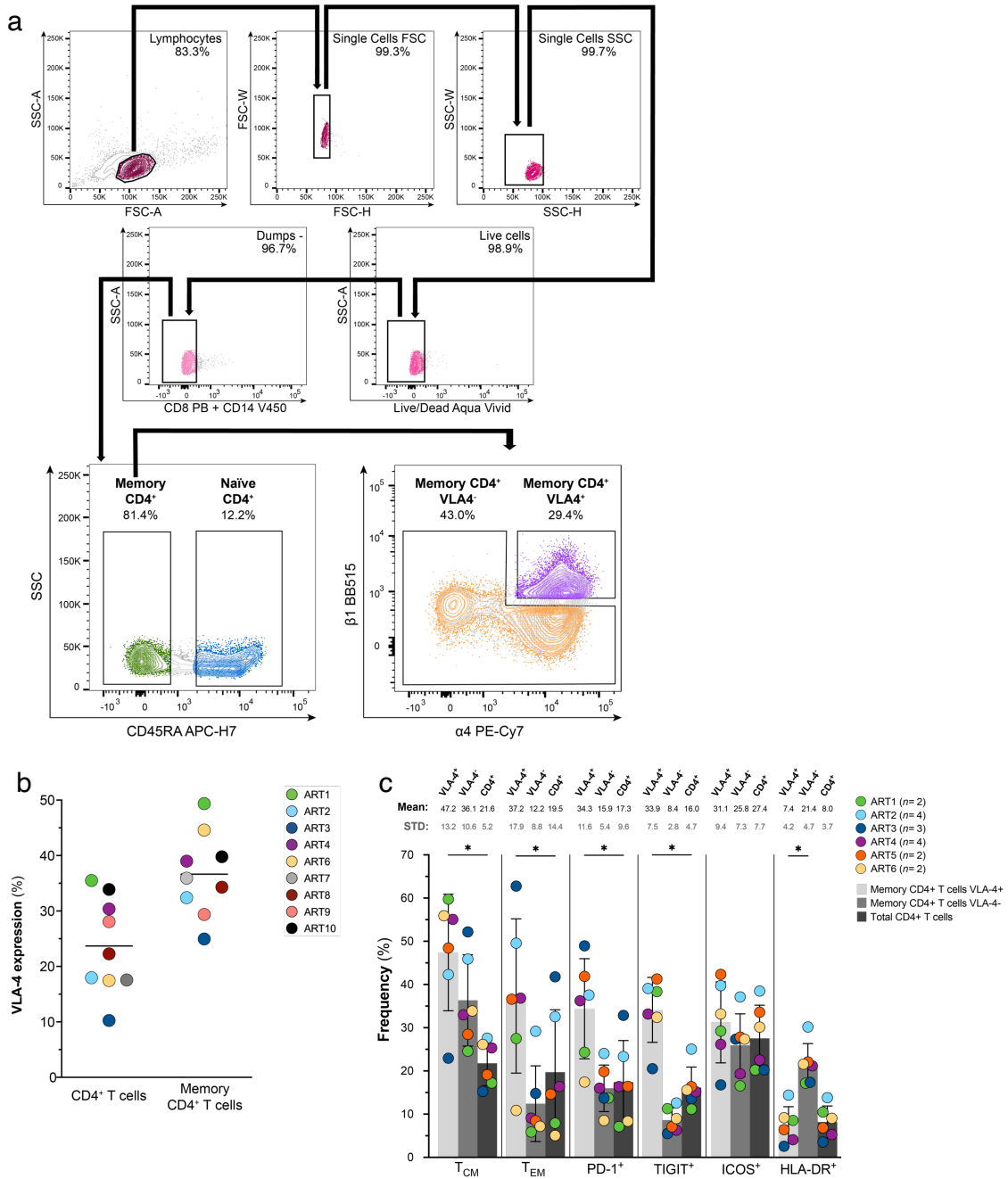
Supplementary Fig.3 $\alpha 4\beta 1$ (VLA-4) phenotype of clonally expanded cells harboring inducible and translation-competent proviruses. Levels of expression of $\alpha 4$ and $\beta 1$ are represented by the ratio between the fluorescence intensity of a cellular marker on each p24+ single sorted-cell and the mean fluorescence intensity of this marker on all CD4+ T cells from the same participant. A normalized expression level above or below 1 (dotted line) reflects a higher or lower expression of this marker on a given p24+ cell compared to all CD4+ T cells, respectively. Each dot represents a single-sorted cell and is color-coded by participant. **a** Normalized double-expression levels of $\alpha 4\beta 1$ for all clonally expanded p24+ cells. Grey bars indicate the mean normalized expression level for each marker with its standard deviation in white. **b** Normalized double-expression levels of $\alpha 4\beta 1$ of individual p24-expressing cells belonging to each individual clone.

Supplementary figure 4.



Supplementary Fig.4 Additional p24+ cells integrity analysis. **a** Alternative ATG start codon in the gag ORF of 35 unique HIV sequences retrieved in p24+ cells from 6 ART-suppressed participants. Initial start codon (HXB2 position 790), p24 region (HXB2 position 1,186) and “later gag start codon” (HXB2 equivalent position) are indicated. **b** Normalized double-expression levels of a4B1 of individual p24-expressing cells based on their proviral integrity. Frequencies of cells expressing high levels of both $\alpha 4$ and $\beta 1$ in each integrity group are indicated at the top.

Supplementary figure 5.



Supplementary Fig.5 α β1 cell-sorting strategy. **a** Gating strategy for memory CD4⁺ T VLA-4⁺ cells sorting. Contour plots from a representative participant are shown. Memory CD4⁺ T cells expressing VLA-4 (VLA-4⁺: CD45RA- α 4^{high} β 1^{high}; purple contour plot) or not (VLA-4⁻: CD45RA- α 4^{low} β 1^{low}; orange contour plot) were sorted by flow cytometry. **b** Frequencies of CD4⁺ T cells and memory CD4⁺ T cells expressing VLA-4 in the blood of 9 ART-suppressed participants. **c** Frequencies of memory CD4⁺ T cells expressing VLA-4 (α 4 β 1⁺; light grey bars), VLA-4⁻ (α 4⁻ and/or β 1⁻; grey bars) and total CD4⁺ T cells (dark grey bars) displaying a T_{CM} or T_{EM} phenotype, and expressing PD-1, TIGIT, ICOS and HLA-DR, in the blood of 6 ART-suppressed participants. Mean frequencies and standard deviations are indicated at the top of the graph. Mean and standard deviation (STD) for each population are indicated at the top. Differences in frequencies between cell populations were assessed by the non-parametric two-tailed Wilcoxon paired t-test (*: $p = 0.0312$).

Chapitre 3 – Le séquençage de génomes de VIH quasi complet provenant de plusieurs organes prélevés *post mortem* chez deux PVVIH sous ART révèle la présence d’expansions clonales disséminées au sein de réservoirs anatomiques distincts

3.1. Aperçu du projet

3.1.1. Contexte

Connaitre où et comment les réservoirs du VIH persistent au sein des différents organes requiert l'accès à de grandes quantités de cellules à partir de tissus profonds qui peuvent être accessibles par autopsie. Afin de préserver la qualité des ARN et des ADN viraux, il est nécessaire que le prélèvement *post mortem* s'effectue dans les heures suivant le décès. En 2018, grâce aux dons généreux de deux Canadiens vivant avec le VIH, un ayant eu recours à l'aide médicale à mourir et l'autre étant décédé en milieu hospitalier des suites d'un cancer, le regroupement de recherche sur les réservoirs du VIH CanCURE a eu le privilège d'obtenir des échantillons de 15 organes différents (plusieurs ganglions lymphatiques et portions du système digestif, ainsi que les poumons, la rate, le foie, le cerveau et les testicules) chez chacun de ces donateurs. Au moment de ces deux dons, peu d'informations concernant les réservoirs de VIH dans différents sites anatomiques chez les PVVIH sous ART depuis des années étaient connus, et encore moins en ce qui concerne l'intégrité et la clonalité de ceux-ci. De plus, la communauté scientifique n'est toujours pas parvenue à un consensus concernant l'existence d'une compartimentalisation des réservoirs anatomiques chez l'humain.

3.1.2. Objectifs

Nous avons utilisé l'expertise de notre laboratoire afin de détecter et de quantifier les ADN et ARN viraux dans tous les échantillons de tissus profonds chez les deux donateurs. Ensuite, nous avons établi les profils d'intégrité et de clonalité des provirus quasi complets présents au sein des

multiples organes malgré plus de 10 ans ART par amplification et séquençage des provirus de quasi pleine longueur.

3.1.3. Statut de l'article

Cet article a été accepté pour publication dans la revue *Cell Reports* le 14 août 2023, et publié en ligne en date du 26 septembre 2023 (<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2211124723010641>).

3.1.4. Contribution détaillée de chacun des auteurs

J'ai eu la charge d'environ 70% du travail de laboratoire associé à ce projet. J'ai conceptualisé et réalisé toutes les expériences de séquençage, et effectué une partie des extractions, en plus d'être responsable de l'analyse de l'intégrité et de la clonalité des séquences provirales. J'ai effectué les analyses de données, construit les figures et écrit l'article. Maria Julia Ruiz et Amélie Pagliuzza ont effectué les extractions et la totalité des quantifications ADN et ARN ainsi que leurs analyses. Rémi Fromentin a participé à l'élaboration des expériences et à l'analyse des données de l'étude. Les données bio-informatiques brutes du séquençage PacBio ont été analysées par Corentin Richard. Les échantillons du premier participant ont été préparés par Maria Julia Ruiz, Rosalie Ponte, Amélie Cattin, Tomas Raul Wiche Salinas, Syim Salahuddin, Teslin Sandstrom et Stephanie Burke Schinkel. Les analyses statistiques de compartimentalisation ont été effectuées par Anika Shadid du laboratoire de Dre. Zabrina L. Brumme. Cécilia Theresa Costiniuk, Mohammed-Ali Jenabian, Petronela Ancuta, Jean-Pierre Routy, Éric A. Cohen, Christopher Power et Jonathan Angel ont été responsables du recrutement des participants et ont fourni leurs précieux conseils dans la conception de l'étude. Nicolas Chomont, à titre de directeur de laboratoire, a supervisé chaque étape, de la conception à l'interprétation des résultats et à l'édition de l'article. Tous les co-auteurs ont fourni leurs commentaires et approuvé leur contribution à l'article.

3.1.5. Résumé

Le VIH persiste dans le sang et les tissus malgré des années de traitement antirétroviral (ART). Cependant, la contribution relative des différents compartiments anatomiques au

réserveur viral chez l'humain reste encore à déterminer. Nous avons réalisé une caractérisation approfondie des réservoirs du VIH retrouvés dans les tissus profonds, prélevés *post mortem* chez deux hommes sous ART depuis des années et ayant fait don de leur corps pour la recherche sur le VIH. Dans tous les tissus, nous avons détecté de l'ADN et les transcrits viraux : leurs quantités varient grandement entre les différents compartiments anatomiques et entre les deux individus. Nous avons obtenu un total de 441 séquences provirales presque complètes (NFL) : les génomes intacts du VIH représentaient respectivement 2 % et 25 % de tous les provirus chez les deux hommes. Ces provirus intacts ont été principalement détectés parmi les organes lymphoïdes secondaires (la rate et les ganglions lymphatiques). Des génomes VIH identiques en plusieurs copies ont été trouvés dans tous les tissus, démontrant que l'expansion clonale est aussi un mécanisme de persistance dans les réservoirs anatomiques. La majorité (>85%) de ces clones étaient partagés parmi plusieurs tissus. Nos résultats suggèrent que les cellules infectées, avec un provirus intact ou défectif, prolifèrent et circulent entre les sites anatomiques, contribuant à l'évolution dynamique des réservoirs du VIH qui persistent pendant des années de traitements antirétroviraux.

3.2. Article #2: Near full-length HIV sequencing in multiple tissues collected post-mortem reveals shared clonal expansions across distinct tissue reservoirs during ART

Caroline Dufour^{1,2#}, Maria Julia Ruiz^{1,2#}, Amélie Pagliuzza², Corentin Richard¹, Aniqah Shahid^{3,4}, Rémi Fromentin^{1,2}, Rosalie Ponte^{5,6}, Amélie Cattin^{1,2}, Tomas Raul Wiche Salinas^{1,2}, Syim Salahuddin⁷, Teslin Sandstrom^{8,9}, Stephanie Burke Schinkel⁹, Cecilia T. Costiniuk^{5,6}, Mohammad-Ali Jenabian⁷, Petronela Ancuta^{1,2}, Jean-Pierre Routy^{6,10}, Éric A. Cohen^{1,11}, Zabrina L. Brumme^{3,4}, Christopher Power^{12,13}, Jonathan B. Angel^{8,9,14}, Nicolas Chomont^{1,2*}

¹Département de Microbiologie, Infectiologie et Immunologie, Université de Montréal, Montreal, Quebec, Canada

²Centre de Recherche du CHUM and Department of Microbiology, Infectiology and Immunology, Université de Montréal, Montreal, Quebec Canada

³Faculty of Health Sciences, Simon Fraser University, Burnaby, British Columbia, Canada

⁴British Columbia Centre for Excellence in HIV/AIDS, Vancouver, British Columbia, Canada

⁵Chronic Viral Illness Service, McGill University Health Centre, Montreal, Quebec, Canada,

⁶Research Institute of McGill University Health Centre, Montreal, Quebec, Canada

⁷Département de Sciences Biologiques, Université du Québec à Montréal, Montreal, Quebec, Canada

⁸Ottawa Hospital Research Institute, Ottawa, Ontario, Canada

⁹Department of Biochemistry, Microbiology & Immunology, University of Ottawa, Ottawa, Ontario, Canada

¹⁰Division of Hematology, McGill University Health Centre, Montreal, Quebec, Canada

¹¹Institut de Recherches Cliniques de Montréal, Montreal, Quebec, Canada

¹²Department of Medicine (Neurology), University of Alberta, 6-11 Heritage Medical Research Center, Edmonton, Alberta, Canada

¹³Department of Psychiatry, University of Alberta, Edmonton, Alberta, Canada

¹⁴Division of Infectious Diseases, Ottawa Hospital-General Campus, Ottawa, Ontario, Canada

Authors contributed equally

*Corresponding author and lead contact:

Nicolas Chomont

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

Tel: +1 514-890-8000 #31266

E-mail: nicolas.chomont@umontreal.ca

The authors have declared that no conflict of interest exists.

Keywords: HIV reservoir, sequencing, clonal expansion, tissue reservoir, post-mortem, autopsy, NFL PCR, replication-competent reservoir, compartmentalization

Abstract

HIV persists in blood and tissues during antiretroviral therapy (ART) but the relative contribution of different anatomical compartments to the viral reservoir in humans remains unknown. We perform an extensive characterization of HIV reservoirs in tissues collected from two men who donated their bodies to HIV cure research and who had been on suppressive ART for years. HIV DNA and HIV transcripts are detected in all tissues, with large variations across anatomical compartments and between participants. A total of 441 near full-length (NFL) proviral sequences were obtained. Intact HIV genomes represent 2% and 25% of all proviruses in the two participants, and are mainly detected in secondary lymphoid organs, with the spleen and mediastinal lymph nodes harboring intact viral genomes in both individuals. Multiple copies of identical HIV genomes are found in all tissues, indicating that clonal expansions are not only common in blood but also in anatomical sites. The majority (>85%) of these expanded clones are shared across multiple tissues. These findings suggest that infected cells harboring either intact or defective proviruses expand, migrate, and possibly circulate between anatomical sites.

Introduction

In most people with HIV (PWH) on stable suppressive therapy, ART interruption leads to viral rebound within a few weeks. Viral resurgence is thought to originate from long-lived reservoirs¹⁻³, primarily memory CD4+ T cells in which integrated and genetically intact proviruses persist⁴⁻¹². HIV-infected cells persist both in blood and tissues during ART and there is a need to better characterize tissue reservoirs since circulating CD4+ T cells represent only 2% of the whole body CD4+ T cells¹³. In addition, myeloid reservoirs such as urethral macrophages¹⁴, alveolar macrophages in the lungs¹⁵⁻¹⁹ and microglia in the brain²⁰ can only be studied by accessing tissues. Furthermore, several studies conducted in humans and non-human primate models of HIV infection indicate that most infected cells persist in tissues²¹⁻²⁵, which are a likely source of rebound^{1,2}. Numerous studies have explored the biology of tissue reservoirs in humans and mainly focused on anatomical compartments that can be sampled through biopsy such as the gut^{23,26,27}, the liver²⁸, lymph nodes^{24,29,30} and the lungs^{19,31}. In addition, characterization of HIV reservoirs in the brain³²⁻³⁴ and testes^{35,36} was made possible by studying tissues collected post mortem or following gender-affirming surgery, respectively. Low levels of residual viral production, and possibly viral replication, may occur in specific tissues considered as sanctuary sites³⁷, either due to their immune-privileged environment [Gut]²⁶, [Testes]³⁵, [LNs]³⁸, [CNS]³⁹ or related to lower antiretroviral drug penetrance [CNS]³³, [LNs]⁴⁰, [LNs]⁴¹. These tissue-specific features are consistent with the observation that proviral populations are compartmentalized in tissue reservoirs as shown in some [Liver]²⁸, [Testes]³⁶, [CNS]⁴², but not all studies [Gut]²⁷, [LNs]³⁰. Tissue compartmentalization of proviral sequences may also result from local clonal expansions of latently infected cells^{36,43,44}, which emphasizes the need to better understand the dynamics of HIV persistence in tissues.

The majority of the aforementioned studies focused on a single organ and used blood CD4+ T cells as comparators, and only a few studies compared HIV reservoirs across multiple compartments. The Last Gift is an end-of-life HIV research study conducted at the University of California San Diego (UCSD), with the goal of understanding the distribution of HIV throughout the human body⁴⁵. Using single genome envelope sequencing approach in samples collected from four people on suppressive ART, Chaillon *et al.* elegantly demonstrated that HIV persists in

multiple locations and that various anatomical sources are responsible for viral dissemination ⁴⁶. However, this subgenomic sequencing approach did not permit the study of the clonality of the viral populations nor their genetic intactness. While it is well established that intact proviruses represent 5 to 10% of all viral genomes in the blood of long-term ART-treated PWH ^{6,10,11,47}, the proviral integrity of tissue reservoirs remains elusive.

Herein, we extensively characterized the HIV proviral landscape in various anatomical compartments in two PWH who generously gave their bodies for research on HIV reservoirs by CanCURE investigators ^{48,49}. We combined measures of HIV DNA, HIV RNA and near-full genome sequencing to assess the clonality of proviral sequences in tissues and to identify anatomical sites harboring genetically intact HIV genomes.

Results

Clinical histories of the two participants

Tissues collected from two men were used to characterize HIV reservoirs in multiple anatomical compartments. Participant #1 was a 67-year-old cis male diagnosed with AIDS-related symptoms in May 1987 (**Figure 1A**). He initiated azidothymidine (AZT) monotherapy a few months after HIV diagnosis and had received various non-suppressive antiretroviral drugs (mono- or combinational therapy) for 13 years, before achieving virological control in 2000. He maintained undetectable viremia, except for one viral rebound in 2006 during a brief interruption of therapy (444,470 HIV RNA copies/mL) and passed away in 2018 from a progressive cachexia after requesting Medical Assistance In Dying (MAID). Participant #1 reported taking his medications up to the day prior to his death. He had records of various opportunistic infections but had no AIDS related diseases at the end of his life. Despite a continuous increase in CD4+ T cells count during years of suppressive ART, his CD4/CD8 ratio remained low (mean of 0.38). Tissue sampling at the autopsy included lymph nodes (mediastinal, hilar, axillar, inguinal, mesenteric), gut (duodenum, jejunum, ileum, colon, rectum), liver, lungs, spleen, testes, and brain (multiple pieces including frontal lobe, parietal lobe, temporal lobe, occipital lobe and cerebellum).

Participant #2 was a 68-year-old cis male diagnosed with HIV in 2003 (**Figure 1B**) and who remained with undetectable plasma viral load between 2010 and his death in 2018. He suffered from several chronic diseases, including diabetes, hypertension, and hepatitis C virus infection, and was also diagnosed with HIV-associated peripheral neuropathy and minor neurocognitive disorder. He died of diffuse large B cell lymphoma. Since his cancer was diagnosed shortly before he passed away, he did not receive any chemotherapy. He maintained a mean CD4/CD8 ratio of 0.37 and developed a drastic CD4 and CD8 cell loss during lymphoma progression weeks before his death (from 1,208 to 110 CD4+ T cells/ μ l), which was likely attributed to lymphoma⁵⁰. Tissue sampling at the autopsy included lymph nodes (mediastinal, inguinal, mesenteric), gut (duodenum, jejunum, ileum, colon, rectum), liver, lungs, spleen, testes, brain (frontal lobe) and spinal cord.

HIV DNA persists in multiple tissue reservoirs

To identify which tissues collected from the two participants can serve as reservoirs for HIV after prolonged ART, we first quantified HIV DNA (LTR-gag) by ultrasensitive quantitative PCR. Seven to 21 individual pieces were analyzed from each of the 15 tissues collected from Participant #1, for a total of 172 samples. HIV DNA was detected in all 15 tissues. Only 12 samples, all from the brain, were devoid of HIV DNA (**Figure 1C**; total number of cells assayed are indicated in **Table S1A**). The frequency of HIV-infected cells (HIV DNA copies per million cells) greatly varied between tissues: brain (2.1) < testes (17.1) < jejunum (27.1) < spleen (51.9) < liver (70.3) < ileum (80.6) < colon (87.2) < lungs (155.9) < mesenteric lymph nodes (216.2) < duodenum (217.7) < inguinal lymph nodes (220.9) < rectum (225.4) < mediastinal lymph nodes (247.4) < hilar lymph nodes (522.7) < axillary lymph nodes (576.6).

We analyzed a total of 83 samples from Participant #2 (3 to 13 samples per tissue). As for Participant #1, total HIV DNA was measured in all 14 tissues but samples devoid of HIV DNA were more common (brain, spinal cord, testes and ileum) (**Figure 1D**; total number of cells assayed are indicated in **Table S1B**). Mean HIV DNA levels (copies per million cells) also varied between tissues: brain (2.0) < testes (3.5) < spinal cord (8.6) < duodenum (17.7) < jejunum (33.0) < rectum (49.3) < lungs (66.5) < colon (69.4) < ileum (74.7) < mesenteric lymph nodes (77.4) < mediastinal lymph nodes (85.7) < inguinal lymph nodes (115.7) < liver (123.6) < spleen (258.8).

Altogether, these results indicate that HIV DNA can be detected in all tissues with substantial interindividual variations. In both participants, the lowest frequencies of HIV-infected cells were measured in brain and testes and the largest amount of HIV DNA were detected in lymphoid tissues, which is consistent with higher frequencies of CD4+ T cells in these sites.

Residual HIV transcription occurs in several tissues

To identify tissue reservoirs in which residual HIV transcription persists during ART, we extracted RNA from all tissues collected (4-11 samples from each site) and measured cell-associated LTR-gag transcripts. In Participant #1, HIV RNA was detected in 9 of the 15 tissues collected, including the mediastinal, hilar, mesenteric, axillary, and inguinal lymph nodes as well

as the lungs, the duodenum, the rectum, and the brain (**Figure 1E**; total amount of RNA assayed are indicated in **Table S1A**). Overall, only 36 out of 112 samples (32%) were positive for cell-associated HIV RNA in this participant, and the levels of HIV RNA were generally low (average transcripts levels = 2.9 HIV RNA copies per μg of RNA). In sharp contrast, HIV transcripts were detected in 84% (n=73) of the 87 samples analyzed from Participant #2 and in all tissues collected (**Figure 1F**; total amount of RNA assayed are indicated in **Table S1A**). The average levels of cell-associated LTR-gag RNA were highly variable between tissues ranging from 1.5 to 5,193 copies per μg of RNA, with the highest levels of HIV transcripts detected in the spleen, lungs, liver, and different parts of the intestine, whereas the brain, the lymph nodes and the duodenum displayed lower levels. Taken together, these results indicate that moderate to high levels of viral transcripts were detected in the lymph nodes and the lungs from both participants, whereas the extent of HIV transcription in other tissue reservoirs largely differed between the two individuals.

Genetic integrity of persistent proviruses in anatomical reservoirs during long-term ART

Since PCR-based assays largely overestimate the size of the HIV reservoir^{11,51}, we sought to identify anatomical sites enriched in genetically intact HIV genomes. We performed NFL HIV genome amplification from serially diluted DNA extracted from all tissues collected to obtain single proviral amplicons that cover 92% of the HIV genome and sequenced them using the PacBio platform⁵². The combination of long-range PCR and long-read sequencing allowed us to avoid reconstruction of NFL proviral sequences. A total of 300 NFL proviral genomes were obtained from Participant #1 (maximum likelihood phylogenetic tree represented in **Figure S1A**). These HIV genomes were retrieved from 14 different tissues including mediastinal lymph node (n=67), spleen (n=53), hilar lymph node (n=39), inguinal lymph node (n=29), mediastinal lymph node (n=28), liver (n=22), colon (n=18), axillary lymph node (n=14), ileum (n=11), rectum (n=8), lungs (n=6), duodenum (n=2), jejunum (n=2) and testes (n=1) (**Figure 2A**). The vast majority of these genomes displayed genetic defects including large internal deletions (41.0%), hypermutations (38.3%), defects in the Ψ locus (13.6%), stop codons (3.7%), inversion (1.3%) and small internal deletions (0.3%) (**Figure S2A** and **Figure S2C**). Overall, there was no enrichment for any type of defect in any specific anatomical site (**Figure S2E**). Strikingly, only 1.7% (n=5) of these HIV genomes were genetically intact (maximum likelihood phylogenetic tree of intact proviruses

represented in **Figure S3A**) and were all found in secondary lymphoid organs (2 in mediastinal lymph node, 1 in mesenteric lymph node and 2 in the spleen, **Figure 2A** and **Figure S2A**).

We obtained 141 NFL proviruses from 8 tissues from Participant #2 (maximum likelihood phylogenetic tree represented in **Figure S1B**). These sequences were retrieved from the intestine (33 in duodenum, 26 in jejunum and 17 in colon), lymphoid organs (21 in spleen, 11 in inguinal lymph node and 9 in mediastinal lymph node), lungs (n=18) and the liver (n=6) (**Figure 2B**). As observed in Participant #1, the majority of these viral genomes displayed large internal deletions (65.3%). Other types of genetic defects were also observed including stop codons (6.4%), small internal deletion (1.4%), defects in the Ψ locus (0.7%) and hypermutations (0.7%) (**Figure S2B**). Similar to Participant #1, categories of genetic defects were not associated with specific anatomical locations (**Figure S2F**). Unexpectedly, a large fraction of HIV genomes (25.5%; n=36) was predicted to be genetically intact (maximum likelihood-based phylogenetic tree of intact proviruses represented in **Figure S3B**). These intact proviruses were located in multiple organs, including the spleen (n=11), lungs (n=10), colon (n=7), liver (n=4), jejunum (n=3) and mediastinal lymph node (n=1) (**Figure 2B** and **Figure S2D**).

In summary, proviral sequencing in multiple tissue reservoirs highlighted interindividual differences in the proportions of defective genomes and identified genetically intact genomes in mesenteric lymph nodes and spleen from both participants.

Co-receptor usage and genetic diversity

To determine if the marked difference in the proportion of intact proviruses between the two participants could be attributed to R5 versus X4 tropism, we predicted the co-receptor usage from the envelope sequence and calculated the genetic diversity of the proviral populations. All proviruses retrieved from Participant #1 were predicted to produce viruses using CCR5 as a co-receptor (**Figure S4A**). In sharp contrast, 94% of the proviral sequences amplified from Participant #2, including 35 of the 36 intact HIV genomes, were predicted to encode CXCR4-tropic viruses (**Figure S4B**). The genetic diversity of the proviral population was greater in Participant #1 compared to Participant #2 (0.061 vs 0.021, respectively), and did not substantially vary between tissues collected from the same person (**Figure S4C**). We conclude that the low CD4 T cell count

measured in Participant #2 is consistent with the preferential usage of CXCR4 as a co-receptor and with the reduced diversity of the proviral populations in this individual. Whether this explains the large frequency of genetically intact proviruses observed in several tissues from this participant remains unclear.

Tissue reservoirs are highly clonal

While it is well-established that the circulating HIV reservoir is largely made of expanded clones⁵³⁻⁶⁴, little is known about the impact of cell proliferation on the maintenance of HIV reservoir in tissues. To address this question, we used the near full-length proviral sequences obtained from multiple tissues from the two participants and defined clonal expansions as cells carrying 100% identical HIV genomes^{6,57,59,62,64,65}. In both participants, approximately half of the proviral sequences were found in multiple copies (48.7% and 46.8% in Participants #1 and #2, respectively). In Participant #1, a total of 28 clonally expanded proviruses were identified, ranging from 2 to 22 copies per clone (**Figure 3A**). Clonally expanded HIV genomes were present in all organs from which more than one provirus was obtained and accounted for 14.3% (axillary lymph node) to 77.3% (liver) of the HIV sequences in a given anatomical site (**Figure 3C**). Similarly, 11 clonal expansions composed of 2 to 23 copies were identified in Participant #2 (**Figure 3B**). These clonally expanded proviral genomes were found in all tissues and represented 11.8% (colon) to 73.1% (jejunum) of all proviruses persisting in a given tissue (**Figure 3D**). By analyzing all clonal expansions observed in the two participants, genomes harboring specific defects were not more likely to be found in multiple copies. Similarly, in both participants, some genetically intact HIV genomes were clonally expanded while others were not, although the relatively small number of intact sequences may have limited our ability to detect small clonal expansions (**Figure S5A and Figure S5B**).

Taken together, these observations reveal that clonal expansions are common in all anatomical sites and confirm that cells harboring both defective and intact HIV genomes can undergo clonal proliferation.

Clonally expanded proviruses are evenly distributed across different tissues

CD4⁺ T cells are characterized by their ability to circulate between lymphoid organs and effector sites^{66,67}, as demonstrated by the presence of memory CD4⁺ T cells expressing the same TCR in different tissues⁶⁸. To determine if expanded clones in the HIV reservoir can also be disseminated across multiple tissues, we assessed the tissue distribution of clonally expanded HIV-infected cells in all anatomical compartments from the two participants. Remarkably, the vast majority of HIV-infected clones were found in multiple tissues (24/28 clones or 86% and 10/11 clones or 91% in Participants #1 and #2, respectively) (**Figure 4, A-B**). Although a significant fraction of the clones we identified were composed of only two sequences (13/28 and 6/11 in Participants #1 and #2 respectively), most of those were found in different compartments (85% and 83%, respectively). Larger clones (>5 copies, n=9) were always detected in at least three distinct anatomical locations (range 3 to 7 tissues). In both participants, we observed significant correlations between the size of the clonal expansion and the number of tissues in which this proviral sequence was detected (**Figure S6A & Figure S6B**), suggesting that the relatively small number of sequences we analyzed likely limited our ability to detect the dissemination of small clones across multiple organs.

Since most of the tissues collected from the two participants harbored clonal expansions that were found in multiple locations, we sought to determine if specific organs were more likely to share the same HIV-infected clone. In both participants, each individual compartment shared identical proviruses with 2 to 11 tissues (**Figure 4, C-D**). Of note, many of these shared clones were also expanded locally. Interestingly, in both participants, lymphoid tissues (lymph nodes and spleen) frequently shared two or more clones, which is in line with the ability of memory CD4⁺ T cells to circulate between different lymphoid organs. This was particularly obvious in Participant #1 in whom strong connections were established between the spleen, mesenteric and mediastinal lymph nodes. We observed a trend for a positive correlation between the number of clones detected in a given tissue and the number of distinct tissues in which these clones were found (**Figure S6C & Figure S6D**), suggesting that although our observations indicate extensive dissemination of HIV-infected clones across multiple compartments, these connections may still be underestimated by the limited number of sequences we obtained.

To determine whether the proviral populations within distinct anatomical compartments displayed genetic compartmentalization, we performed the Correlation Coefficient (CC) test, a tree-based compartmentalization test that can be applied to sequence datasets collected from multiple sites^{69,70}. This analysis, which was restricted to distinct proviruses per tissue, revealed no evidence for compartmentalization of the proviral populations in the two participants ($p \geq 0.05$, **Table S2**). The same analysis conducted with the intact sequences from Participant #2 also did not show evidence of compartmentalization.

In summary, our results indicate that tissue reservoirs are made of large clones that are often disseminated between distinct tissues and suggest that HIV-infected cells may circulate between lymphoid and effector organs even after prolonged ART.

Discussion

It is well established that the majority of HIV-infected cells persist in tissues in people on long term ART ²¹⁻²⁵. Thanks to the generosity of PWH, the scientific community has now the opportunity to study these tissue reservoirs in humans through post-mortem analyses ^{45,46,48,71,72}. In this study, we performed extensive tissue sampling and characterization of HIV genomes in two PWH on long-term suppressive ART who altruistically donated their bodies for HIV cure research. Consistent with previous findings ^{33,46,73}, HIV-infected cells were detected in every tissue we investigated, with inter-organ and inter-individual variations. The CD4 and CD8 lymphopenia reported a few days before the death of Participant #2, a common phenomenon in people with diffuse large B cell lymphoma ⁵⁰, may partially explain the relatively low HIV DNA levels measured in this individual. Consistent with this model in which the richness in CD4+ T cells could impact HIV DNA burden, highest levels of HIV DNA were detected in lymphoid tissues in which CD4+ T cells are abundant (spleen and lymph nodes), whereas the brain was the tissue with the lowest levels of HIV DNA in both participants. Of note, our approach did not distinguish cellular reservoirs (such as the lymphoid and myeloid cells) and we cannot conclude on the relative contributions of different cell types to HIV persistence in different anatomical compartments.

Since RNA is rapidly degraded after death, its optimal quantification requires freshly collected tissues, ideally sampled less than 6 hours post-mortem ⁷⁴. In our study, tissues were processed only within 24 hours after death, and it is likely that our measures were underestimated due to the degradation of viral RNA. Nonetheless, we detected HIV transcripts in the majority of the tissues we analyzed, indicating that low levels of HIV transcription occur in tissue reservoirs during suppressive ART.

To establish a qualitative cartography of the viral reservoirs in these two participants, we performed a genotypic characterization of the proviruses using near full-length HIV sequencing. Large internal deletions, which are caused by template switching errors during the reverse transcription step ¹¹, were the most common defects in both participants. A striking difference between the two participants was the much higher proportion of genomes displaying hypermutations in Participant#1 compared to Participant #2 (38.3% and 0.7% respectively). This

may result from the difference in the duration of unsuppressed viremia between these two individuals. Indeed, hypermutations are primarily caused by APOBEC3G, a restriction factor incorporated in newly formed virions⁷⁵ and that leads to the accumulation of G-to-A mutations⁷⁶ in HIV genomes, which are continuously archived in the reservoir during viremia. The fact that Participant #2 achieved viral suppression more rapidly than Participant #1 may explain why hypermutations were less commonly found in his reservoir.

The proportion of intact genomes also greatly differed between the two individuals. Participant #1 displayed scarce intact HIV genomes in tissues, at lower levels than what was previously observed in the blood of people on ART^{6,10,11,47}. Since we did not have access to blood, we cannot conclude if this small proportion of genetically intact genomes is specific to tissues or whether other clinical parameters may have accounted for this phenomenon.

In participant #2, we detected an unexpectedly high frequency of intact HIV genomes (25%). Since the participant was still taking ART at the time of death, this large proportion of intact proviruses is unlikely to be attributed to a burst in viral replication. Rather, the fact that all these closely related intact sequences were found in distant tissues suggests that infectious viral particles circulating throughout the body before ART initiation established persistent reservoirs in different locations. Intriguingly, most of these proviruses were predicted to produce X4-tropic virions, consistent with the relatively low CD4 T cell counts measured in this participant. Recent evidence suggests that CXCR4-using viruses, which primarily target naive and central memory cells, may display less defects than CCR5-using strains⁷⁷. Thus, the X4-tropism of HIV in this participant may explain the greater proportion of genetically intact genomes, although future studies will be needed to untangle this intriguing association.

Despite these important differences between the two participants, the tissue reservoirs of both individuals were composed of approximately 50% of clonally expanded proviruses. Our measures of clonality performed in multiple anatomic reservoirs reinforces the idea that clonal expansion is a major mechanism of viral persistence in tissues, as suggested in previous studies examining gut and lymph node reservoirs exclusively^{3,43,44,54,59}. More importantly, the majority of these expanded clones were found in multiple anatomical compartments. Our study does not allow us

to determine if these expansions and recirculation of infected cells occurred before therapy was initiated, or during ART suppression. Similar studies conducted in unsuppressed participants are warranted to address this question.

Another interesting aspect of our study is the opportunity that our NFL HIV proviral sequencing offers to assess viral compartmentalization. Results from the Last Gift study demonstrated dissemination of HIV-infected cells from lymphoid organs and gut to other sites⁴⁶ as well as the homogeneity of bNAbs susceptibility of HIV-infected cells between anatomical sites⁷¹, suggesting a lack of compartmentalization. Our results confirm and extend these findings by showing that, after collapsing clones to a single representative sequence per tissue, there was no statistically significant evidence of genetic compartmentalization between anatomical sites in either participant. The large proportion of identical expanded T cell clones persisting in multiple distinct tissue reservoirs is also consistent with a lack of genetic compartmentalization. Overall, our results suggest that HIV persistence in lymphoid tissues is primarily ensured by the proliferation of latently infected cells rather than by ongoing viral replication. Since we did not recover a sufficient number of NFL sequences from the brain and the testes of the participants, we cannot exclude the possibility of HIV compartmentalization in these tissues, as was reported in previous studies^{36,71}.

In conclusion, our results indicate extensive clonality of HIV reservoirs in human tissues and suggest that HIV-infected cells recirculate between anatomical compartments. Our results show that, in addition to the highly dynamic nature of the pool of infected cells reported in the blood, the recirculation of HIV-infected cells and their local expansions in tissues also contribute to the complexity of the HIV reservoirs in humans.

Limitations of the study

We acknowledge several limitations to this study. The full genome sequencing approach we used may be biased due to the inefficiency of long-distance PCR as shown recently by White *et al.*⁷⁸. This limitation is mitigated by the use of a highly processive enzyme in this study, which, as we described previously, efficiently amplifies more than 70% of full length viral genomes⁵². Blood was not sampled prior to the death of the two participants, which restricted our analysis

to tissue reservoirs. Comparing the clonality and intactness of the HIV proviral populations between the circulating and the tissue reservoirs would have been of interest ^{46,71}. In addition, although we took all precautions to avoid contamination of the tissues by blood, obtaining sequences from the circulating reservoir would have allowed us to formally exclude this possibility. Finally, since tissues were snap-frozen rapidly after collection, we did not have access to live cells and could not assess the inducibility of the HIV genomes persisting in these tissue reservoirs. We have since modified our protocol for future investigations to include blood collection prior to death, to isolate live cells rapidly, to collect larger pieces of multiple brain areas and to include other tissues such as the bone marrow, which is an important site for memory CD4+ T cell maintenance ⁷⁹.

Acknowledgements

The authors are grateful to the people with HIV who volunteered to participate in this study as well as to their families and friends. We thank Bonnie Hiener and Sarah Palmer for their precious help with the FLIPS assay and with the analysis pipeline. We thank the NC3 core laboratory at the CRCHUM (Olfa Debbeche) as well as Anita Del Corpo and Angela Durant for CanCURE coordination. The following reagents were obtained through the NIH HIV Reagent Program, Division of AIDS, NIAID, NIH: ACH-2 Cells, ARP-349, contributed by Dr. Thomas Folks.

Author contributions

C.D. designed and performed the experiments, analyzed the data, and wrote the manuscript draft. M.J.R, A.P and R.F designed and performed the experiments and analyzed the data. C.R. performed the bioinformatics analysis of the sequencing data. A.S. and Z.L.B. performed the compartmentalization analysis. M.J.R., R.P., A.C., T.W.S., S.S., T.S., S.B.S. processed the samples. C.T.C., M.-A.J., P.A., J.-P.R., E.A.C., C.P. and J.A. managed the participant recruitment and provided conceptual advice. N.C. designed the experiments and supervised the study. All authors read, edited, and approved the final version of manuscript.

Funding

This work was supported by the Canadian Institutes for Health Research (CIHR; the Canadian HIV Cure Enterprise (CanCURE) Team Grant HB2 – 164064 and operating grants #148540 and #451304), the Réseau SIDA et maladies infectieuses du Fonds de Recherche du Québec - Santé (FRQ-S). The work was also supported in part by CIHR project grant PJT-159625. CD is supported by a doctoral fellowship from the CIHR (#413313) and from the FRQ-S (#275429). AS holds a CIHR doctoral fellowship. CTC is holds an FRQ-S Chercheur boursier clinicien 2 award. J.-P.R is the holder of the Louis Lowenstein Chair in Hematology and Oncology, McGill University. N.C. is supported by Research Scholar Senior Career Awards of the FRQ-S (#253292). CTC holds a FRQ-S Junior 2 Research Scholar Career Awards. ZLB is the recipient of a Scholar Award from Michael Smith Health Research BC. MAJ holds the CIHR Canada Research Chair tier 2 in Immuno-virology. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Disclaimer

The views expressed are those of the authors.

Methods

Resource availability

Lead Contact

Further information and requests for resources and reagents should be directed to and will be fulfilled by the lead contact, Nicolas Chomont (nicolas.chomont@umontreal.ca).

Materials availability

This study did not generate new unique reagents.

Data and Code availability

- Data availability: Dataset are available on Mendeley Data (DOI: 10.17632/gx4y2gmbv2.1).
- Code availability: All sequences reported in this manuscript are available in GenBank with the following reference codes, ON816664 to ON817104 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/popset/2306704384?report=genbank>).
- Any additional information required to reanalyze the data reported in this paper is available from the lead contact upon request.

Experimental model and study participant details

Tissue sampling post mortem

Clinical histories of the male participants are detailed in the Results section. Autopsies were conducted within 24 hours following death. Multiple tissues were collected and extensively washed with PBS to limit blood contamination. For Participant #1, samples included lymph nodes (mediastinal, hilar, axillar, inguinal, mesenteric), gut (duodenum, jejunum, ileum, colon, rectum), liver, testes, lungs, spleen, and brain. For Participant #2, samples included lymph nodes (mediastinal, inguinal, mesenteric), gut (duodenum, jejunum, ileum, colon, rectum), liver, testes, lungs, spleen, brain, and spinal cord. Tissues were snap-frozen in liquid nitrogen immediately after collection and kept at -80°C until processing.

Study approval

Autopsied tissues were collected and used with consent and the approval by the Ottawa Health Science Network Research Ethics Board (Participant #1, protocol number 20180219-01H) and the Health Research Ethics Board at the University of Alberta (Participant #2, protocol number pro00002291).

Method details

HIV DNA and RNA quantifications

Multiple small fragments from all collected tissues were thawed, lysed and homogenized in RLTPlus lysis buffer (Qiagen) at room temperature using the RNA program of the gentleMACS Dissociator (Miltenyi). Genomic DNA and total RNA were simultaneously extracted using the AllPrep DNA/RNA Universal kit (Qiagen), according to the manufacturer's instructions. The frequency of cells harboring total HIV DNA (5' LTR-gag) was quantified by real-time PCR on the extracted genomic DNA, as previously described⁸⁰. Triplicate measures were performed on each sample and serial dilutions of ACH-2 cells were used as a standard curve. Samples with less than 10,000 cells (based on CD3 quantification), were excluded from the analysis. HIV LTR-gag RNA copies were quantified by real-time nested RT-PCR, using *in vitro* transcribed RNA as a standard for absolute quantification. In a first PCR reaction, HIV RNA was reverse-transcribed and pre-amplified using the Superscript III one-step RT-PCR System (Invitrogen) in a 25 µL reaction containing 12.5 µL of 2X reaction buffer, 0.5 µM of each primer (Table S3), 1 µL of Superscript III RT/Platinum Taq mix, 2.75 µL of H₂O and 8.5 µL of extracted RNA. Reverse transcription was performed at 50°C for 30min, followed by a denaturation step at 94°C for 2min, and 16 cycles of: 15s at 94°C, 30s at 55°C, 1min at 68°C, with a final elongation step of 5min at 68°C. For the second PCR, the pre-amplified cDNA was amplified by real-time PCR on a Rotor-Gene Q instrument, using the Quantinova Probe Master Mix (Qiagen). Each reaction was performed in a 20 µL volume containing 6.4 µL of the first PCR product (diluted 1/10), 10 µL of 2X master mix, 1.25 µM of each primer, and 0.2 µM of TaqMan probe (Table S1). The amplification steps were: initial denaturation at 95°C for 4min, followed by 40 cycles of 3s at 95°C, 10s at 60°C. LTR-gag HIV RNA copies were

normalized per μg of RNA. Samples with less than 5 ng/ μl of RNA were excluded from the analysis. For both quantifications, samples with detectable HIV (DNA or RNA), but with values below the limit of detection (LOD), are shown as the LOD. Negative samples are shown as open symbols and are plotted at the LOD.

HIV near full-length amplification and sequencing

Extracted genomic DNA from each tissue was first diluted to a concentration of 1.5 to 3 copies of HIV DNA per well, and 12 reactions of each dilution were amplified by a nested PCR covering 95% of the HIV genome. The near full-length HIV PCR (NFL-HIV) is derived from previous assays^{6,11} and has been described elsewhere^{52,62}. HIV proviruses were first amplified for a 25-cycle 3-step PCR protocol (as recommended by the manufacturer) in a 40 μl reaction using Invitrogen Platinum SuperFi II MasterMix with 0.2 μM of each primer (Table S1). 5 μl of each 4X diluted pre-amplification products were used for a second round of amplification using inner primers (Table S1) for 30 cycles in a 30 μl final volume reaction. ACH-2 extracted DNA was used as a positive control. Positive wells were determined by visualization of amplicons on a 0.8% agarose gel. The proper limiting diluting factor was established based on the Poisson distribution, aiming to obtain 30% positive reactions. Once the correct dilution factor was established, all DNA extracted samples were used for NFL-HIV PCR. Positive wells were selected for PacBio next-generation sequencing. Each HIV pre-amplified DNA were re-amplified with 96 different Pacbio barcode combinations added to the inner PCR primers. Barcoded amplicons were purified using AMPure XP beads, following the manufacturer's instructions, prior to Nanodrop quantification. 50 ng of each of the 96-barcoded amplicons were pooled together and sequenced (G enome Qu ebec, Canada; DNA Link, South Korea). The demultiplex barcodes analysis was powered by the Lima PacBio software v2.0.0. High-quality phased consensus sequences representing near full-length HIV-1 genome sequences with high fidelity and without the need for reconstruction were generated with the LAA PacBio algorithm v2.4.2. Any sequences that did not blast with HIV, that was identical to the ACH-2 sequence (GenBank reference MN691959 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MN691959>) (possible positive control contamination), or that lacked one of the primer's sequences, were discarded from further analysis.

Integrity and statistical analysis

Near full-length HIV genome analysis

All proviral sequences were aligned to the reference HXB2 sequence using Multiple Fast Fourier transform algorithm (MAFFT v7.471)⁸¹ with strategy E-INS-i and a scoring matrix of 1PAM/k=2 (online <https://mafft.cbrc.jp/alignment/server/> or with Geneious Prime (v2021.1.1) plugging). For integrity analysis, all sequences containing (in this order) inversions, hypermutations, large internal deletions, stop codons and/or frameshift, defects in the Ψ locus or small internal deletions in a coding region, were considered defective. Inversions were detected manually at the alignment step, since only the reverse complement of inversions can be aligned with HXB2. Hypermutations were detected using the online HIVDatabase QCTool (<https://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/QC/index.html>). Large internal deletions were defined as any sequences shorter than 8,800 bp (excluding the primer's regions). Stop codons/frameshifts and small internal deletions were identified using both HIVDatabase GeneCutter online tool (https://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/GENE_CUTTER/cutter.html) and ProseqIT (https://psd.cancer.gov/tools/pvs_annot.php). Any defect in the Ψ locus (MSD point mutation; stem loop 2 deletion; packaging signal deletion) were determined using ProseqIT tool, and manually confirmed by looking at the alignment with the reference HXB2 sequence. Clonal sequences were defined as proviral amplicons 100% identical to each other and were determined using the HIVDatabase ElimDupes online tool (<https://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/elimdupesv2/elimdupes.html>) and confirmed using the Geneious Prime diversity tool. Phylogenetic trees were built with IQ-Tree2⁸², using a Maximum-likelihood tree GTR+I+G model with 1,000 bootstraps. Co-receptor tropism was predicted using the geno2pheno coreceptor tool (<https://coreceptor.geno2pheno.org>) and the 10% FPR threshold. Diversity was evaluated using MEGA, with the distance estimation Tamura Nei model, using 1,000 bootstraps variance estimation method.

Compartmentalization analyses

Each participant's proviral sequence dataset was examined to define a HIV genomic region that captured sufficient within-host diversity to undertake compartmentalization analyses, yet

minimized the number of sequences that would need to be excluded due to large deletions. For Participant #1, whose dataset harbored substantial diversity yet frequent large deletions, the region spanning HXB2 genomic coordinates: 673 → 1224 (encompassing the Ψ region and a portion of *gag*) was selected. For Participant #2, who had less diversity and fewer large deletions, the full *gag* region (HXB2 genomic coordinates: 790 → 2292) was selected.

Each participant's dataset was analyzed in two ways: 1) after excluding all hypermutated sequences and 2) with all sequences retained, but where sites of hypermutation were identified in each participant's dataset using Hypermut⁸³, and stripped out of the alignment prior to compartmentalization analysis.

Sequence datasets were aligned in a codon-aware manner using MAFFT v7.471⁸¹. Alignments were inspected and manually edited in AliView v1.26⁸⁴. A maximum-likelihood within-host phylogeny was inferred from each alignment using IQ-Tree2⁸² following automated model selection using ModelFinder⁸⁵.

We used the Correlation Coefficient (CC) test, a tree-based compartmentalization test that can be applied to sequence datasets collected from multiple sites^{69,70}. The CC test correlates the phylogenetic distances between each pair of sequences, with information on their tissue of origin. While these distances can be defined based on the branch lengths separating them in the tree, we used the more simple metric of the number of internal branches separating them, to further mitigate any biases caused by hypermutated sequences. Coefficients can range from -1 to +1, where larger positive values denote stronger support for compartmentalization, and values that are zero or negative denote no compartmentalization. A p-value <0.05 was considered evidence of compartmentalization. A custom R script for the CC test is available at <https://github.com/brj1/HIVCompartmentalization>.

Quantification and statistical analyses

All data were analyzed using GraphPad Prism v9.3.0. Correlation analyses are indicated in the figure legend. Sankey plots were created with Power User Excel plug-in (<https://support.powerusersoftware.com/support/solutions/articles/80001021629-sankey-charts>).

Reference

1. Rothenberger, M.K., Keele, B.F., Wietgreffe, S.W., Fletcher, C.V., Beilman, G.J., Chipman, J.G., Khoruts, A., Estes, J.D., Anderson, J., Callisto, S.P., et al. (2015). Large number of rebounding/founder HIV variants emerge from multifocal infection in lymphatic tissues after treatment interruption. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112, E1126-1134. [10.1073/pnas.1414926112](https://doi.org/10.1073/pnas.1414926112).
2. Lee, E., von Stockenstrom, S., Morcilla, V., Odevall, L., Hiener, B., Shao, W., Hartogensis, W., Bacchetti, P., Milush, J., Liegler, T., et al. (2020). Impact of Antiretroviral Therapy Duration on HIV-1 Infection of T Cells within Anatomic Sites. *J Virol* 94. [10.1128/JVI.01270-19](https://doi.org/10.1128/JVI.01270-19).
3. De Scheerder, M.A., Vrancken, B., Dellicour, S., Schlub, T., Lee, E., Shao, W., Rutsaert, S., Verhofstede, C., Kerre, T., Malfait, T., et al. (2019). HIV Rebound Is Predominantly Fueled by Genetically Identical Viral Expansions from Diverse Reservoirs. *Cell Host Microbe* 26, 347-358 e347. [10.1016/j.chom.2019.08.003](https://doi.org/10.1016/j.chom.2019.08.003).
4. 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. [10.1126/science.278.5341.1291](https://doi.org/10.1126/science.278.5341.1291).
5. Chomont, N., El-Far, M., Ancuta, P., Trautmann, L., Procopio, F.A., Yassine-Diab, B., Boucher, G., Boulassel, M.R., Ghattas, G., Brenchley, J.M., et al. (2009). HIV reservoir size and persistence are driven by T cell survival and homeostatic proliferation. *Nat Med* 15, 893-900. [10.1038/nm.1972](https://doi.org/10.1038/nm.1972).
6. 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 reports* 21, 813-822. [10.1016/j.celrep.2017.09.081](https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.09.081).
7. Chun, T.W., Carruth, L., Finzi, D., Shen, X., DiGiuseppe, J.A., Taylor, H., Hermankova, M., Chadwick, K., Margolick, J., Quinn, T.C., et al. (1997). Quantification of latent tissue reservoirs and total body viral load in HIV-1 infection. *Nature* 387, 183-188. [10.1038/387183a0](https://doi.org/10.1038/387183a0).

8. Chun, T.W., Finzi, D., Margolick, J., Chadwick, K., Schwartz, D., and Siliciano, R.F. (1995). In vivo fate of HIV-1-infected T cells: quantitative analysis of the transition to stable latency. *Nat Med* 1, 1284-1290. 10.1038/nm1295-1284.
9. 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. 10.1073/pnas.94.24.13193.
10. Lee, G.Q., Orlova-Fink, N., Einkauf, K., Chowdhury, F.Z., Sun, X., Harrington, S., Kuo, H.H., Hua, S., Chen, H.R., Ouyang, Z., et al. (2017). Clonal expansion of genome-intact HIV-1 in functionally polarized Th1 CD4+ T cells. *J Clin Invest* 127, 2689-2696. 10.1172/JCI93289.
11. Ho, Y.C., Shan, L., Hosmane, N.N., Wang, J., Laskey, S.B., Rosenbloom, D.I., Lai, J., Blankson, J.N., Siliciano, J.D., and Siliciano, R.F. (2013). Replication-competent noninduced proviruses in the latent reservoir increase barrier to HIV-1 cure. *Cell* 155, 540-551. 10.1016/j.cell.2013.09.020.
12. 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. 10.1126/science.278.5341.1295.
13. Ganusov, V.V., and De Boer, R.J. (2007). Do most lymphocytes in humans really reside in the gut? *Trends Immunol* 28, 514-518. 10.1016/j.it.2007.08.009.
14. Ganor, Y., Real, F., Sennepin, A., Dutertre, C.A., Prevedel, L., Xu, L., Tudor, D., Charmeteau, B., Couedel-Courteille, A., Marion, S., et al. (2019). HIV-1 reservoirs in urethral macrophages of patients under suppressive antiretroviral therapy. *Nat Microbiol* 4, 633-644. 10.1038/s41564-018-0335-z.
15. Jambo, K.C., Banda, D.H., Kankwatira, A.M., Sukumar, N., Allain, T.J., Heyderman, R.S., Russell, D.G., and Mwandumba, H.C. (2014). Small alveolar macrophages are infected preferentially by HIV and exhibit impaired phagocytic function. *Mucosal immunology* 7, 1116-1126. 10.1038/mi.2013.127.

16. Clarke, J.R., Gates, A.J., Coker, R.J., Douglass, J.A., Williamson, J.D., and Mitchell, D.M. (1994). HIV-1 proviral DNA copy number in peripheral blood leucocytes and bronchoalveolar lavage cells of AIDS patients. *Clin Exp Immunol* 96, 182-186. 10.1111/j.1365-2249.1994.tb06539.x.
17. Lambotte, O., Taoufik, Y., de Goer, M.G., Wallon, C., Goujard, C., and Delfraissy, J.F. (2000). Detection of infectious HIV in circulating monocytes from patients on prolonged highly active antiretroviral therapy. *J Acquir Immune Defic Syndr* 23, 114-119. 10.1097/00126334-200002010-00002.
18. Cribbs, S.K., Lennox, J., Caliendo, A.M., Brown, L.A., and Guidot, D.M. (2015). Healthy HIV-1-infected individuals on highly active antiretroviral therapy harbor HIV-1 in their alveolar macrophages. *AIDS Res Hum Retroviruses* 31, 64-70. 10.1089/AID.2014.0133.
19. Costiniuk, C.T., Salahuddin, S., Farnos, O., Olivenstein, R., Pagliuzza, A., Orlova, M., Schurr, E., De Castro, C., Bourbeau, J., Routy, J.P., et al. (2018). HIV persistence in mucosal CD4+ T cells within the lungs of adults receiving long-term suppressive antiretroviral therapy. *AIDS* 32, 2279-2289. 10.1097/QAD.0000000000001962.
20. Valdebenito, S., Castellano, P., Ajasin, D., and Eugenin, E.A. (2021). Astrocytes are HIV reservoirs in the brain: A cell type with poor HIV infectivity and replication but efficient cell-to-cell viral transfer. *J Neurochem* 158, 429-443. 10.1111/jnc.15336.
21. Estes, J.D., Kityo, C., Ssali, F., Swainson, L., Makamdop, K.N., Del Prete, G.Q., Deeks, S.G., Luciw, P.A., Chipman, J.G., Beilman, G.J., et al. (2017). Defining total-body AIDS-virus burden with implications for curative strategies. *Nat Med* 23, 1271-1276. 10.1038/nm.4411.
22. Leyre, L., Kroon, E., Vandergeeten, C., Sacdalan, C., Colby, D.J., Buranapraditkun, S., Schuetz, A., Chomchey, N., de Souza, M., Bakeman, W., et al. (2020). Abundant HIV-infected cells in blood and tissues are rapidly cleared upon ART initiation during acute HIV infection. *Sci Transl Med* 12. 10.1126/scitranslmed.aav3491.

23. Chun, T.W., Nickle, D.C., Justement, J.S., Meyers, J.H., Roby, G., Hallahan, C.W., Kottlilil, S., Moir, S., Mican, J.M., Mullins, J.I., et al. (2008). Persistence of HIV in gut-associated lymphoid tissue despite long-term antiretroviral therapy. *J Infect Dis* 197, 714-720. 10.1086/527324.
24. Banga, R., Procopio, F.A., Noto, A., Pollakis, G., Cavassini, M., Ohmiti, K., Corpataux, J.M., de Leval, L., Pantaleo, G., and Perreau, M. (2016). PD-1(+) and follicular helper T cells are responsible for persistent HIV-1 transcription in treated aviremic individuals. *Nat Med* 22, 754-761. 10.1038/nm.4113.
25. Yukl, S.A., Shergill, A.K., Ho, T., Killian, M., Girling, V., Epling, L., Li, P., Wong, L.K., Crouch, P., Deeks, S.G., et al. (2013). 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* 208, 1212-1220. 10.1093/infdis/jit308.
26. Yukl, S.A., Gianella, S., Sinclair, E., Epling, L., Li, Q., Duan, L., Choi, A.L., Girling, V., Ho, T., Li, P., et al. (2010). Differences in HIV burden and immune activation within the gut of HIV-positive patients receiving suppressive antiretroviral therapy. *J Infect Dis* 202, 1553-1561. 10.1086/656722.
27. Imamichi, H., Degray, G., Dewar, R.L., Mannon, P., Yao, M., Chairez, C., Sereti, I., and Kovacs, J.A. (2011). Lack of compartmentalization of HIV-1 quasispecies between the gut and peripheral blood compartments. *J Infect Dis* 204, 309-314. 10.1093/infdis/jir259.
28. Blackard, J.T., Ma, G., Martin, C.M., Rouster, S.D., Shata, M.T., and Sherman, K.E. (2011). HIV variability in the liver and evidence of possible compartmentalization. *AIDS Res Hum Retroviruses* 27, 1117-1126. 10.1089/AID.2010.0329.
29. Gunthard, H.F., Havlir, D.V., Fiscus, S., Zhang, Z.Q., Eron, J., Mellors, J., Gulick, R., Frost, S.D., Brown, A.J., Schleif, W., et al. (2001). Residual human immunodeficiency virus (HIV) Type 1 RNA and DNA in lymph nodes and HIV RNA in genital secretions and in cerebrospinal fluid after suppression of viremia for 2 years. *J Infect Dis* 183, 1318-1327. 10.1086/319864.

30. Lorenzo-Redondo, R., Fryer, H.R., Bedford, T., Kim, E.Y., Archer, J., Pond, S.L.K., Chung, Y.S., Penugonda, S., Chipman, J., Fletcher, C.V., et al. (2016). Persistent HIV-1 replication maintains the tissue reservoir during therapy. *Nature* 530, 51-56. 10.1038/nature16933.
31. Meziane, O., Salahuddin, S., Pham, T.N.Q., Farnos, O., Pagliuzza, A., Olivenstein, R., Thomson, E., Alexandrova, Y., Orlova, M., Schurr, E., et al. (2020). HIV Infection and Persistence in Pulmonary Mucosal Double Negative T Cells In Vivo. *J Virol* 94. 10.1128/JVI.01788-20.
32. Kumar, A.M., Borodowsky, I., Fernandez, B., Gonzalez, L., and Kumar, M. (2007). Human immunodeficiency virus type 1 RNA Levels in different regions of human brain: quantification using real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *J Neurovirol* 13, 210-224. 10.1080/13550280701327038.
33. Lamers, S.L., Rose, R., Maidji, E., Agsalda-Garcia, M., Nolan, D.J., Fogel, G.B., Salemi, M., Garcia, D.L., Bracci, P., Yong, W., et al. (2016). HIV DNA Is Frequently Present within Pathologic Tissues Evaluated at Autopsy from Combined Antiretroviral Therapy-Treated Patients with Undetectable Viral Loads. *J Virol* 90, 8968-8983. 10.1128/JVI.00674-16.
34. Cochrane, C.R., Angelovich, T.A., Byrnes, S.J., Waring, E., Guanizo, A.C., Trollope, G.S., Zhou, J., Vue, J., Senior, L., Wanicek, E., et al. (2022). Intact HIV Proviruses Persist in the Brain Despite Viral Suppression with ART. *Ann Neurol* 92, 532-544. 10.1002/ana.26456.
35. Jenabian, M.A., Costiniuk, C.T., Mehraj, V., Ghazawi, F.M., Fromentin, R., Brousseau, J., Brassard, P., Belanger, M., Ancuta, P., Bendayan, R., et al. (2016). Immune tolerance properties of the testicular tissue as a viral sanctuary site in ART-treated HIV-infected adults. *AIDS* 30, 2777-2786. 10.1097/QAD.0000000000001282.
36. Miller, R.L., Ponte, R., Jones, B.R., Kinloch, N.N., Omondi, F.H., Jenabian, M.A., Dupuy, F.P., Fromentin, R., Brassard, P., Mehraj, V., et al. (2019). HIV Diversity and Genetic Compartmentalization in Blood and Testes during Suppressive Antiretroviral Therapy. *J Virol* 93. 10.1128/JVI.00755-19.

37. Kepler, T.B., and Perelson, A.S. (1998). Drug concentration heterogeneity facilitates the evolution of drug resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 11514-11519. 10.1073/pnas.95.20.11514.
38. Fukazawa, Y., Lum, R., Okoye, A.A., Park, H., Matsuda, K., Bae, J.Y., Hagen, S.I., Shoemaker, R., Deleage, C., Lucero, C., et al. (2015). B cell follicle sanctuary permits persistent productive simian immunodeficiency virus infection in elite controllers. *Nat Med* 21, 132-139. 10.1038/nm.3781.
39. Persidsky, Y., and Poluektova, L. (2006). Immune privilege and HIV-1 persistence in the CNS. *Immunol Rev* 213, 180-194. 10.1111/j.1600-065X.2006.00440.x.
40. Fletcher, C.V., Staskus, K., Wietgreffe, S.W., Rothenberger, M., Reilly, C., Chipman, J.G., Beilman, G.J., Khoruts, A., Thorkelson, A., Schmidt, T.E., et al. (2014). Persistent HIV-1 replication is associated with lower antiretroviral drug concentrations in lymphatic tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111, 2307-2312. 10.1073/pnas.1318249111.
41. Rosen, E.P., Deleage, C., White, N., Sykes, C., Brands, C., Adamson, L., Luciw, P., Estes, J.D., and Kashuba, A.D.M. (2022). Antiretroviral drug exposure in lymph nodes is heterogeneous and drug dependent. *J Int AIDS Soc* 25, e25895. 10.1002/jia2.25895.
42. Gianella, S., Kosakovsky Pond, S.L., Oliveira, M.F., Scheffler, K., Strain, M.C., De la Torre, A., Letendre, S., Smith, D.M., and Ellis, R.J. (2016). Compartmentalized HIV rebound in the central nervous system after interruption of antiretroviral therapy. *Virus Evol* 2, vew020. 10.1093/ve/vew020.
43. McManus, W.R., Bale, M.J., Spindler, J., Wiegand, A., Musick, A., Patro, S.C., Sobolewski, M.D., Musick, V.K., Anderson, E.M., Cyktor, J.C., et al. (2019). HIV-1 in lymph nodes is maintained by cellular proliferation during antiretroviral therapy. *J Clin Invest* 129, 4629-4642. 10.1172/JCI126714.
44. Wu, V.H., Nobles, C.L., Kuri-Cervantes, L., McCormick, K., Everett, J.K., Nguyen, S., Del Rio Estrada, P.M., Gonzalez-Navarro, M., Torres-Ruiz, F., Avila-Rios, S., et al. (2020). Assessment of

HIV-1 integration in tissues and subsets across infection stages. *JCI Insight* 5. 10.1172/jci.insight.139783.

45. Gianella, S., Taylor, J., Brown, T.R., Kaytes, A., Achim, C.L., Moore, D.J., Little, S.J., Ellis, R.J., and Smith, D.M. (2017). Can research at the end of life be a useful tool to advance HIV cure? *AIDS* 31, 1-4. 10.1097/QAD.0000000000001300.

46. Chaillon, A., Gianella, S., Dellicour, S., Rawlings, S.A., Schlub, T.E., De Oliveira, M.F., Ignacio, C., Porrachia, M., Vrancken, B., and Smith, D.M. (2020). HIV persists throughout deep tissues with repopulation from multiple anatomical sources. *J Clin Invest* 130, 1699-1712. 10.1172/JCI134815.

47. Bruner, K.M., Murray, A.J., Pollack, R.A., Soliman, M.G., Laskey, S.B., Capoferri, A.A., Lai, J., Strain, M.C., Lada, S.M., Hoh, R., et al. (2016). Defective proviruses rapidly accumulate during acute HIV-1 infection. *Nat Med* 22, 1043-1049. 10.1038/nm.4156.

48. Lessard, D., Dube, K., Bilodeau, M., Keeler, P., Margolese, S., Rosenes, R., Sinyavskaya, L., Durand, M., Benko, E., Kovacs, C., et al. (2022). Willingness of Older Canadians with HIV to Participate in HIV Cure Research Near and After the End of Life: A Mixed-Method Study. *AIDS Res Hum Retroviruses* 38, 670-682. 10.1089/AID.2022.0006.

49. Sandstrom, T.S., Burke Schinkel, S.C., and Angel, J.B. (2019). Medical Assistance in Death as a Unique Opportunity to Advance Human Immunodeficiency Virus Cure Research. *Clin Infect Dis* 69, 1063-1067. 10.1093/cid/ciz068.

50. Hou, H., Luo, Y., Tang, G., Zhang, B., Ouyang, R., Wang, T., Huang, M., Wu, S., Li, D., and Wang, F. (2021). Dynamic changes in peripheral blood lymphocyte subset counts and functions in patients with diffuse large B cell lymphoma during chemotherapy. *Cancer Cell Int* 21, 282. 10.1186/s12935-021-01978-w.

51. Eriksson, S., Graf, E.H., Dahl, V., Strain, M.C., Yukl, S.A., Lysenko, E.S., Bosch, R.J., Lai, J., Chioma, S., Emad, F., et al. (2013). Comparative analysis of measures of viral reservoirs in HIV-1 eradication studies. *PLoS Pathog* 9, e1003174. 10.1371/journal.ppat.1003174.

52. Dufour, C., Richard, C., Pardons, M., Massanella, M., Ackaoui, A., Murrell, B., Routy, B., Thomas, R., Routy, J., Fromentin, R., and Chomont, N. (2023). Phenotypic characterization of

single CD4+ T cells harboring genetically intact and inducible HIV genomes. Nature communications in press.

53. Maldarelli, F., Wu, X., Su, L., Simonetti, F.R., Shao, W., Hill, S., Spindler, J., Ferris, A.L., Mellors, J.W., Kearney, M.F., et al. (2014). Specific HIV integration sites are linked to clonal expansion and persistence of infected cells. *Science* 345, 179-183. [10.1126/science.1254194](https://doi.org/10.1126/science.1254194).

54. von Stockenstrom, S., Odevall, L., Lee, E., Sinclair, E., Bacchetti, P., Killian, M., Epling, L., Shao, W., Hoh, R., Ho, T., et al. (2015). Longitudinal Genetic Characterization Reveals That Cell Proliferation Maintains a Persistent HIV Type 1 DNA Pool During Effective HIV Therapy. *J Infect Dis* 212, 596-607. [10.1093/infdis/jiv092](https://doi.org/10.1093/infdis/jiv092).

55. Cohn, L.B., Silva, I.T., Oliveira, T.Y., Rosales, R.A., Parrish, E.H., Learn, G.H., Hahn, B.H., Czartoski, J.L., McElrath, M.J., Lehmann, C., et al. (2015). HIV-1 integration landscape during latent and active infection. *Cell* 160, 420-432. [10.1016/j.cell.2015.01.020](https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.01.020).

56. Cohn, L.B., da Silva, I.T., Valieris, R., Huang, A.S., Lorenzi, J.C.C., Cohen, Y.Z., Pai, J.A., Butler, A.L., Caskey, M., Jankovic, M., and Nussenzweig, M.C. (2018). Clonal CD4(+) T cells in the HIV-1 latent reservoir display a distinct gene profile upon reactivation. *Nat Med* 24, 604-609. [10.1038/s41591-018-0017-7](https://doi.org/10.1038/s41591-018-0017-7).

57. Pinzone, M.R., VanBelzen, D.J., Weissman, S., Bertuccio, M.P., Cannon, L., Venanzi-Rullo, E., Migueles, S., Jones, R.B., Mota, T., Joseph, S.B., et al. (2019). Longitudinal HIV sequencing reveals reservoir expression leading to decay which is obscured by clonal expansion. *Nature communications* 10, 728. [10.1038/s41467-019-08431-7](https://doi.org/10.1038/s41467-019-08431-7).

58. Coffin, J.M., Wells, D.W., Zerbato, J.M., Kuruc, J.D., Guo, S., Luke, B.T., Eron, J.J., Bale, M., Spindler, J., Simonetti, F.R., et al. (2019). Clones of infected cells arise early in HIV-infected individuals. *JCI Insight* 4. [10.1172/jci.insight.128432](https://doi.org/10.1172/jci.insight.128432).

59. Kuo, H.H., Banga, R., Lee, G.Q., Gao, C., Cavassini, M., Corpataux, J.M., Blackmer, J.E., Zur Wiesch, S., Yu, X.G., Pantaleo, G., et al. (2020). Blood and Lymph Node Dissemination of Clonal Genome-Intact Human Immunodeficiency Virus 1 DNA Sequences During Suppressive Antiretroviral Therapy. *J Infect Dis* 222, 655-660. [10.1093/infdis/jiaa137](https://doi.org/10.1093/infdis/jiaa137).

60. Gantner, P., Pagliuzza, A., Pardons, M., Ramgopal, M., Routy, J.P., Fromentin, R., and Chomont, N. (2020). Single-cell TCR sequencing reveals phenotypically diverse clonally expanded cells harboring inducible HIV proviruses during ART. *Nature communications* 11, 4089. [10.1038/s41467-020-17898-8](https://doi.org/10.1038/s41467-020-17898-8).
61. Simonetti, F.R., Zhang, H., Soroosh, G.P., Duan, J., Rhodehouse, K., Hill, A.L., Beg, S.A., McCormick, K., Raymond, H.E., Nobles, C.L., et al. (2021). Antigen-driven clonal selection shapes the persistence of HIV-1-infected CD4+ T cells in vivo. *J Clin Invest* 131. [10.1172/JCI145254](https://doi.org/10.1172/JCI145254).
62. Sannier, G., Dube, M., Dufour, C., Richard, C., Brassard, N., Delgado, G.G., Pagliuzza, A., Baxter, A.E., Niessl, J., Brunet-Ratnasingham, E., et al. (2021). Combined single-cell transcriptional, translational, and genomic profiling reveals HIV-1 reservoir diversity. *Cell reports* 36, 109643. [10.1016/j.celrep.2021.109643](https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.109643).
63. Cole, B., Lambrechts, L., Boyer, Z., Noppe, Y., De Scheerder, M.A., Eden, J.S., Vrancken, B., Schlub, T.E., McLaughlin, S., Frenkel, L.M., et al. (2022). Extensive characterization of HIV-1 reservoirs reveals links to plasma viremia before and during analytical treatment interruption. *Cell reports* 39, 110739. [10.1016/j.celrep.2022.110739](https://doi.org/10.1016/j.celrep.2022.110739).
64. Cho, A., Gaebler, C., Oliveira, T., Ramos, V., Saad, M., Lorenzi, J.C.C., Gazumyan, A., Moir, S., Caskey, M., Chun, T.W., and Nussenzweig, M.C. (2022). Longitudinal clonal dynamics of HIV-1 latent reservoirs measured by combination quadruplex polymerase chain reaction and sequencing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 119. [10.1073/pnas.2117630119](https://doi.org/10.1073/pnas.2117630119).
65. Mendoza, P., Jackson, J.R., Oliveira, T.Y., Gaebler, C., Ramos, V., Caskey, M., Jankovic, M., Nussenzweig, M.C., and Cohn, L.B. (2020). Antigen-responsive CD4+ T cell clones contribute to the HIV-1 latent reservoir. *J Exp Med* 217. [10.1084/jem.20200051](https://doi.org/10.1084/jem.20200051).
66. Gowans, J.L., and Knight, E.J. (1964). The Route of Re-Circulation of Lymphocytes in the Rat. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* 159, 257-282.
67. Butcher, E.C., and Picker, L.J. (1996). Lymphocyte Homing and Homeostasis. *Science* 272, 60-66.

68. Miron, M., Meng, W., Rosenfeld, A.M., Dvorkin, S., Poon, M.M.L., Lam, N., Kumar, B.V., Louzoun, Y., Luning Prak, E.T., and Farber, D.L. (2021). Maintenance of the human memory T cell repertoire by subset and tissue site. *Genome Med* 13, 100. [10.1186/s13073-021-00918-7](https://doi.org/10.1186/s13073-021-00918-7).
69. Shahid, A., Jones, B.R., Yang, J.S.W., Dong, W., Shaipanich, T., Donohoe, K., Brumme, C.J., Joy, J.B., Leung, J.M., and Brumme, Z.L. (2022). HIV proviral genetic diversity, compartmentalization and inferred dynamics in lung and blood during long-term suppressive antiretroviral therapy. *PLoS Pathog* 18, e1010613. [10.1371/journal.ppat.1010613](https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1010613).
70. Critchlow, D.E., Li, S., Nourijelyani, K., and Pearl, D.K. (2000). Some statistical methods for phylogenetic trees with application to HIV disease. *Mathematical and Computer Modelling* 32, 69-81. [https://doi.org/10.1016/S0895-7177\(00\)00120-5](https://doi.org/10.1016/S0895-7177(00)00120-5).
71. Wang, C., Schlub, T.E., Yu, W.H., Tan, C.S., Stefic, K., Gianella, S., Smith, D.M., Lauffenburger, D.A., Chaillon, A., and Julg, B. (2022). Landscape of Human Immunodeficiency Virus Neutralization Susceptibilities Across Tissue Reservoirs. *Clin Infect Dis* 75, 1342-1350. [10.1093/cid/ciac164](https://doi.org/10.1093/cid/ciac164).
72. Bozzi, G., Simonetti, F.R., Watters, S.A., Anderson, E.M., Gouzoulis, M., Kearney, M.F., Rote, P., Lange, C., Shao, W., Gorelick, R., et al. (2019). No evidence of ongoing HIV replication or compartmentalization in tissues during combination antiretroviral therapy: Implications for HIV eradication. *Sci Adv* 5, eaav2045. [10.1126/sciadv.aav2045](https://doi.org/10.1126/sciadv.aav2045).
73. Liu, Z., Julius, P., Kang, G., West, J.T., and Wood, C. (2022). Subtype C HIV-1 reservoirs throughout the body in ART-suppressed individuals. *JCI Insight* 7. [10.1172/jci.insight.162604](https://doi.org/10.1172/jci.insight.162604).
74. Rawlings, S.A., Layman, L., Smith, D., Scott, B., Ignacio, C., Porrachia, M., Concha-Garcia, S., Hendrickx, S., Kaytes, A., Taylor, J., and Gianella, S. (2020). Performing rapid autopsy for the interrogation of HIV reservoirs. *AIDS* 34, 1089-1092. [10.1097/QAD.0000000000002546](https://doi.org/10.1097/QAD.0000000000002546).
75. Sheehy, A.M., Gaddis, N.C., Choi, J.D., and Malim, M.H. (2002). Isolation of a human gene that inhibits HIV-1 infection and is suppressed by the viral Vif protein. *Nature* 418, 646-650. [10.1038/nature00939](https://doi.org/10.1038/nature00939).

76. Harris, R.S., Bishop, K.N., Sheehy, A.M., Craig, H.M., Petersen-Mahrt, S.K., Watt, I.N., Neuberger, M.S., and Malim, M.H. (2003). DNA Deamination Mediates Innate Immunity to Retroviral Infection. *Cell* 113, 803-809. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)00423-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00423-9).
77. Roche, M., Tumpach, C., Symons, J., Gartner, M., Anderson, J.L., Khoury, G., Cashin, K., Cameron, P.U., Churchill, M.J., Deeks, S.G., et al. (2020). CXCR4-Using HIV Strains Predominate in Naive and Central Memory CD4(+) T Cells in People Living with HIV on Antiretroviral Therapy: Implications for How Latency Is Established and Maintained. *J Virol* 94. 10.1128/JVI.01736-19.
78. White, J.A., Simonetti, F.R., Beg, S., McMyn, N.F., Dai, W., Bachmann, N., Lai, J., Ford, W.C., Bunch, C., Jones, J.L., et al. (2022). Complex decay dynamics of HIV virions, intact and defective proviruses, and 2LTR circles following initiation of antiretroviral therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 119. 10.1073/pnas.2120326119.
79. Zaikos, T.D., Terry, V.H., Sebastian Kettinger, N.T., Lubow, J., Painter, M.M., Virgilio, M.C., Neevel, A., Taschuk, F., Onafuwa-Nuga, A., McNamara, L.A., et al. (2018). Hematopoietic Stem and Progenitor Cells Are a Distinct HIV Reservoir that Contributes to Persistent Viremia in Suppressed Patients. *Cell reports* 25, 3759-3773 e3759. 10.1016/j.celrep.2018.11.104.
80. 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. 10.1128/JVI.00609-14.
81. Katoh, K., and Standley, D.M. (2013). MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Mol Biol Evol* 30, 772-780. 10.1093/molbev/mst010.
82. Minh, B.Q., Schmidt, H.A., Chernomor, O., Schrempf, D., Woodhams, M.D., von Haeseler, A., and Lanfear, R. (2020). IQ-TREE 2: New Models and Efficient Methods for Phylogenetic Inference in the Genomic Era. *Mol Biol Evol* 37, 1530-1534. 10.1093/molbev/msaa015.

83. Rose, P.P., and Korber, B.T. (2000). Detecting hypermutations in viral sequences with an emphasis on G --> A hypermutation. *Bioinformatics* 16, 400-401. [10.1093/bioinformatics/16.4.400](https://doi.org/10.1093/bioinformatics/16.4.400).
84. Larsson, A. (2014). AliView: a fast and lightweight alignment viewer and editor for large datasets. *Bioinformatics* 30, 3276-3278. [10.1093/bioinformatics/btu531](https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu531).
85. Kalyaanamoorthy, S., Minh, B.Q., Wong, T.K.F., von Haeseler, A., and Jermini, L.S. (2017). ModelFinder: fast model selection for accurate phylogenetic estimates. *Nature methods* 14, 587-589. [10.1038/nmeth.4285](https://doi.org/10.1038/nmeth.4285).

Figures

Figure 1.

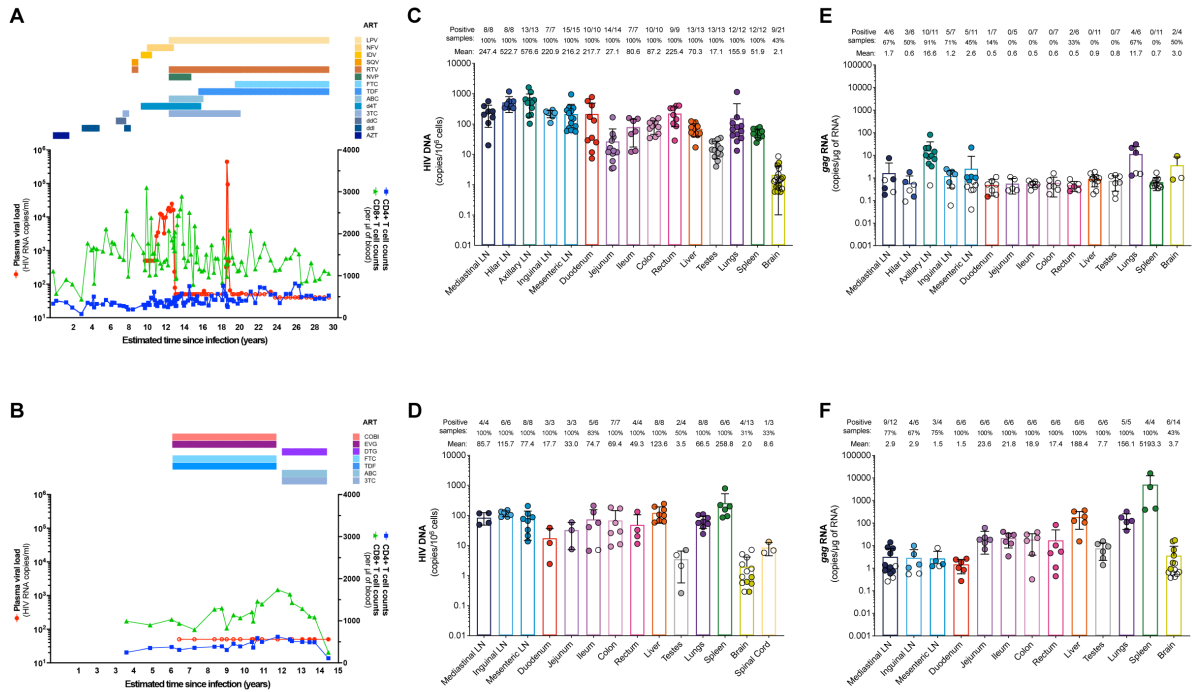


Figure 1: HIV DNA and RNA persist in multiple tissues collected from two participants with different clinical histories (A and B) Clinical histories of Participants #1 and #2 from the estimated time of infection to the time of death. Plasma viral loads (red line; left Y axis), CD4 and CD8 counts (blue and green lines, respectively; right Y axis), and antiretroviral drug regimens (color-coded; at the top) are represented. (C and D) HIV DNA (LTR-gag) quantifications in multiple tissues collected post-mortem from Participants #1 and #2. Results are presented as HIV DNA copies per million cells. (E and F) HIV RNA (LTR-gag) quantifications in the same tissues. Results are presented as HIV RNA copies per million of RNA. All tissues are color-coded. Each dot represents an individual piece of tissue and multiple pieces were used for each tissue. Open circles represent the limit of detection (calculated from the cell input) in pieces in which HIV DNA or RNA was not detected. Bars show the mean values with standard deviation. Data are represented as mean \pm SD. The numbers of tissue pieces in which HIV DNA or RNA was detected are indicated at the top, with their corresponding percentage. LN: lymph node; LPV: lopinavir; NVP: nelfinavir; IDV: indinavir; SQV: saquinavir; RTV: ritonavir; NVP: nevirapine; FTC: emtricitabine; TDF: tenofovir disoproxil fumarate; ABC: abacavir; d4T: stavudine; 3TC: lamivudine; ddC: dideoxycytidine; ddi: didanosine; AZT: zidovudine; COBI: cobicistat; EVG: elvitegravir; DTG: dolutegravir.

Figure 2.

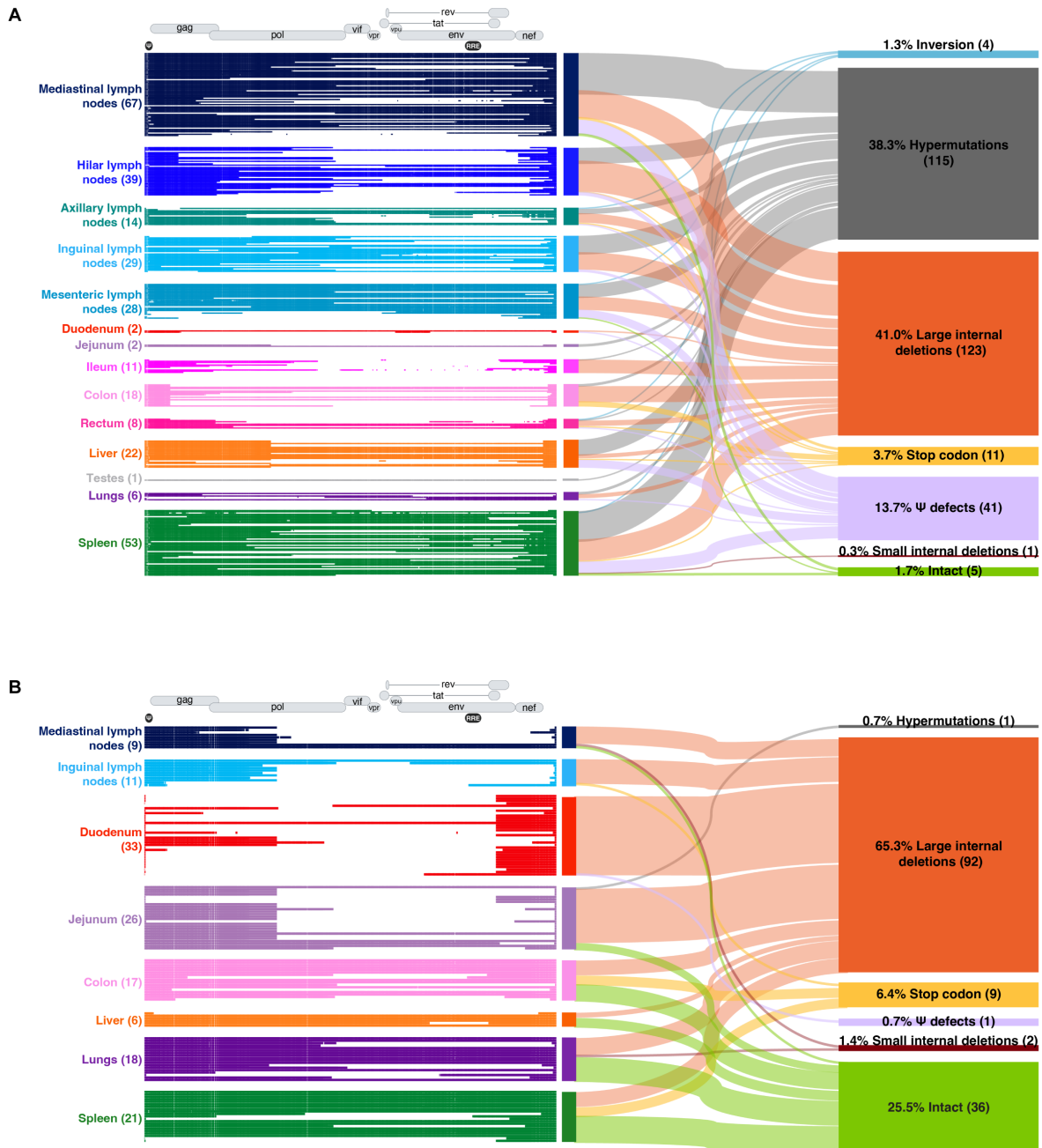


Figure 2: Intact HIV genomes persist in tissues after prolonged ART (A and B) Near full-length genome sequences covering all 9 ORFs (*gag*, *pol*, *vif*, *vpr*, *vpu*, *tat*, *rev*, *env* and *nef*) and 2 regulatory regions (Ψ locus and RRE) of HIV (position 651 to 9,676 in HXB2 reference; depicted in grey at the top) were obtained. NFL proviral sequence alignments are shown for Participants #1 and #2. For each color-coded tissue, the numbers of HIV genomes obtained are indicated on the left. Sankey plots on the right represent the distribution of defective (inversions in blue, hypermutations in grey, large internal deletions in orange, stop codons in yellow, Ψ defects in lilac, small internal deletions in burgundy) and intact (green) proviruses in the different tissues. For each category, the number of sequences and the percentage are indicated.

Figure 3.

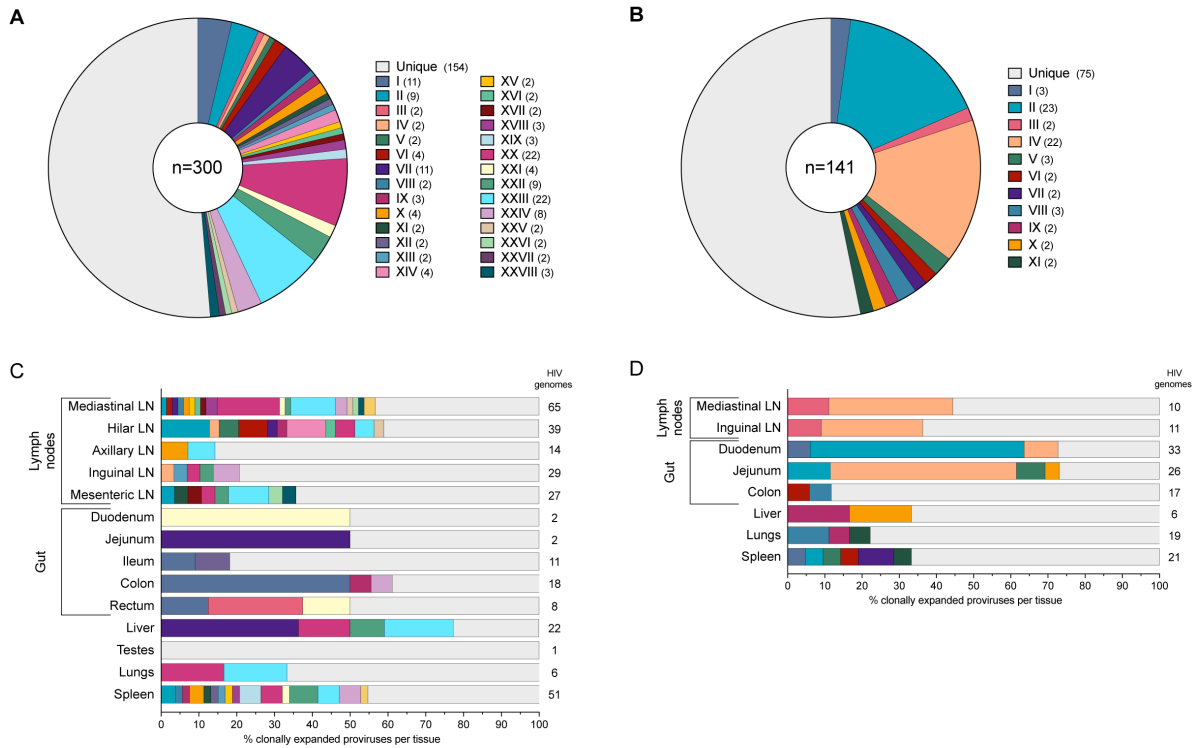


Figure 3: Tissue reservoirs during long-term ART are highly clonal (A and B) Proportions of clonally expanded HIV genomes are illustrated for Participants #1 and #2. Clonal expansions (100% identical HIV genomes) are color-coded and identified by a Roman numeral. The number of individual proviruses within a given clone is indicated in brackets. The total number of sequences analyzed is indicated in the center of the pie chart. **(C and D)** Distribution of the clones in all tissues is represented for Participants #1 and #2 (see Figure 3 A-B for color-code). The number of HIV genomes analyzed in each tissue is indicated on the right. LN: lymph node.

Figure 4.

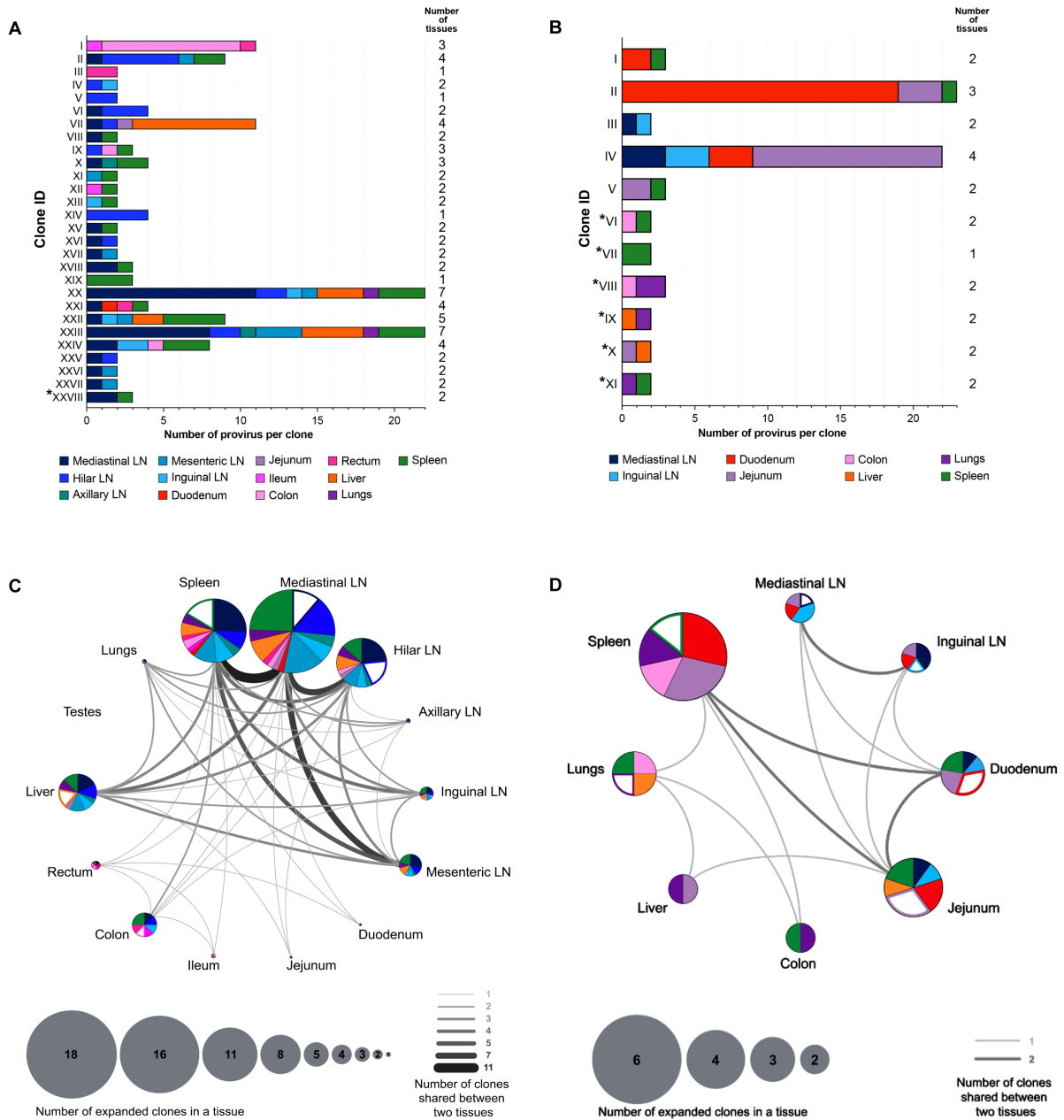


Figure 4: Clonally expanded HIV-infected cells are distributed across different tissues (A and B) Tissue distributions of each clonally expanded HIV-infected cell are shown for Participants #1 and #2. Clones are identified by a Roman numeral and tissues are color-coded. The total number of tissues in which a given clone was found is indicated on the right. Asterisk indicated genetically intact HIV clones. **(C and D)** Anatomical distributions of clonal expansions in Participants #1 and #2. The size of the pie chart corresponds to the number of expanded clones found in a given tissue. Each wedge represents the proportion of clones shared between two different tissues (each tissue is color-coded, see legend in Figure 4A-B). Expanded clones within a given tissue are depicted by open-color wedges. Lines are connecting tissues to illustrate the distribution of expanded clones between organs and the thickness of the lines reflects the number of clones shared between two different tissues. LN: lymph node.

Supplementary information files

Supplemental figure 1.

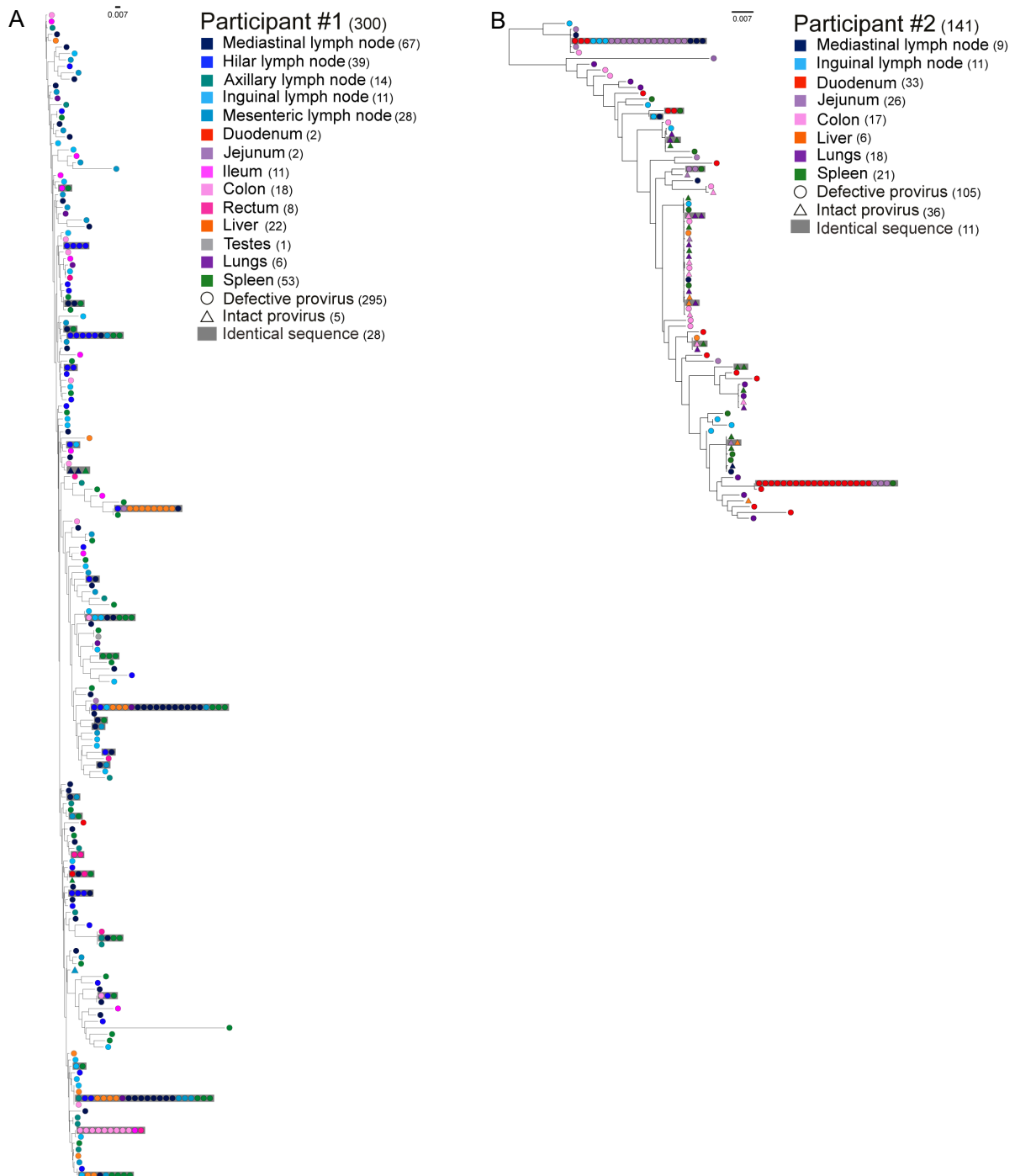


Figure S1: Phylogeny and diversity of proviruses in tissues after prolonged ART (A and B) Maximum-likelihood phylogenetic trees for Participants #1 and #2. Circles represent defective proviruses and intact genomes are shown as triangles. Symbols are color-coded to identify the anatomical locations of the HIV genomes. Identical proviruses are framed in grey rectangles.

Supplemental figure 2.

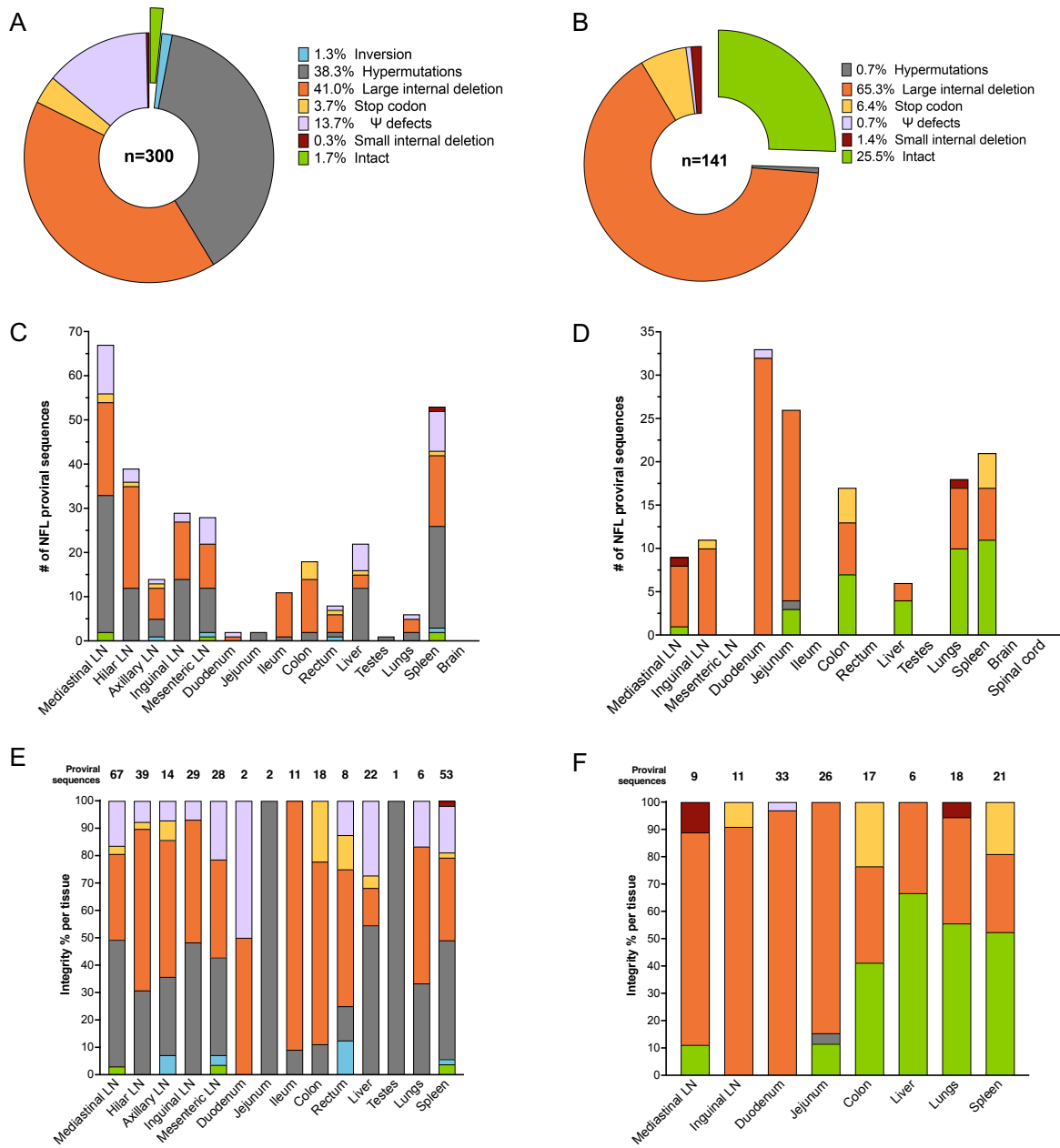


Figure S2: HIV genome integrity in multiple tissues (A and B) Proportions of defective (inversions in blue; hypermutations in grey; large internal deletions in orange; stop codons in yellow; Ψ defects in lilac; small internal deletions in burgundy) and intact (green) proviruses in all tissues collected from Participants #1 and #2. Total number of HIV genomes is indicated in center of the pie chart. **(C and D)** Provirus obtained from each tissue are color-coded by their integrity category for Participants #1 and #2. **(E and F)** Proportions of proviruses from each integrity group are shown in each tissue from Participants #1 and #2. The total number of HIV genomes retrieved from each tissue is indicated at the top of the bar graphs. LN: lymph node; NFL: near full-length.

Supplemental figure 3.

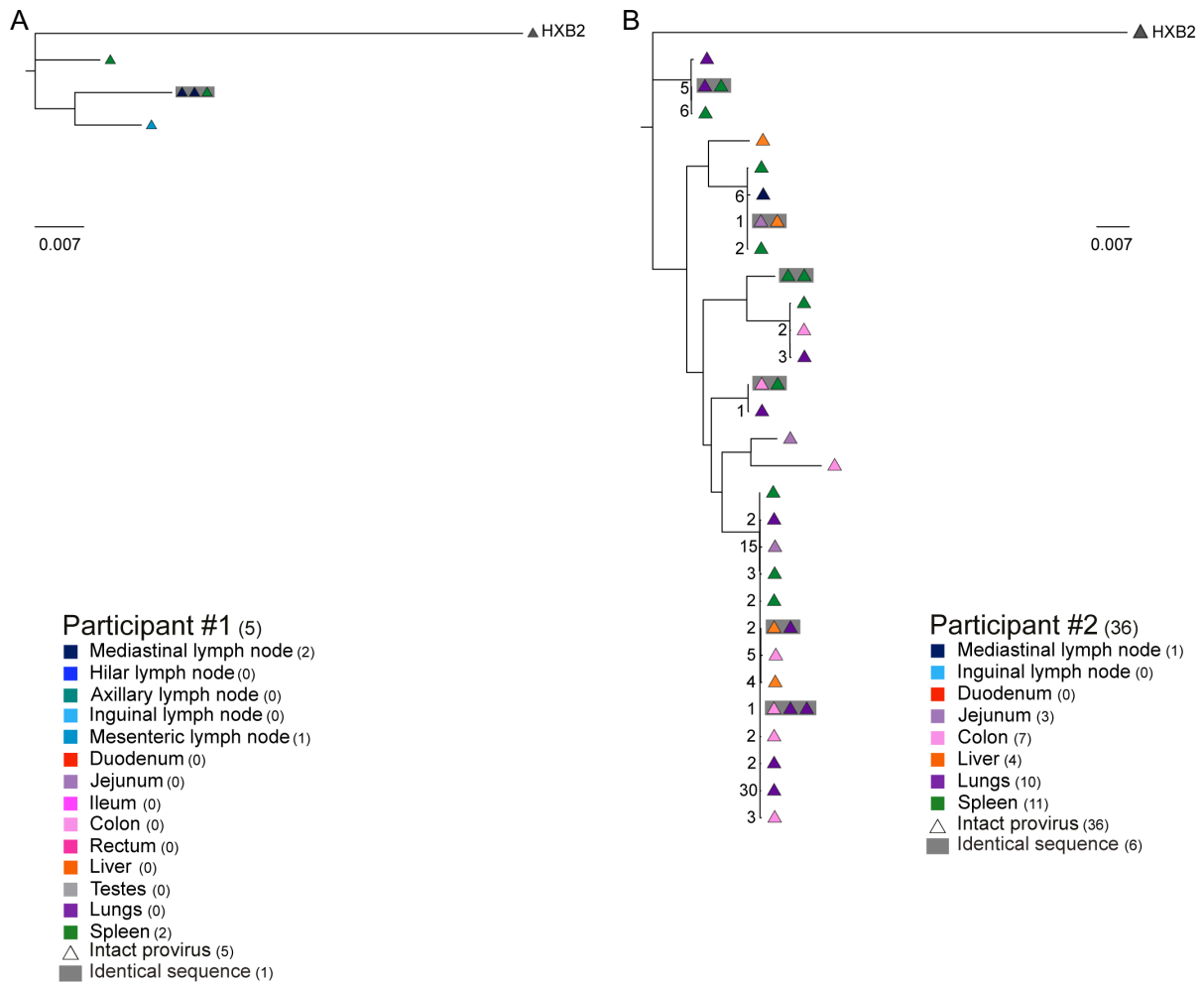


Figure S3: Phylogeny and diversity of intact proviruses in tissues after prolonged ART

(A and B) Maximum-likelihood phylogenetic trees for Participants #1 and #2. Symbols are color-coded to identify the anatomical locations of the HIV genomes. For each cluster of similar intact sequences, the number of nucleotide differences are indicated at the left of the tree.

Supplemental figure 4.

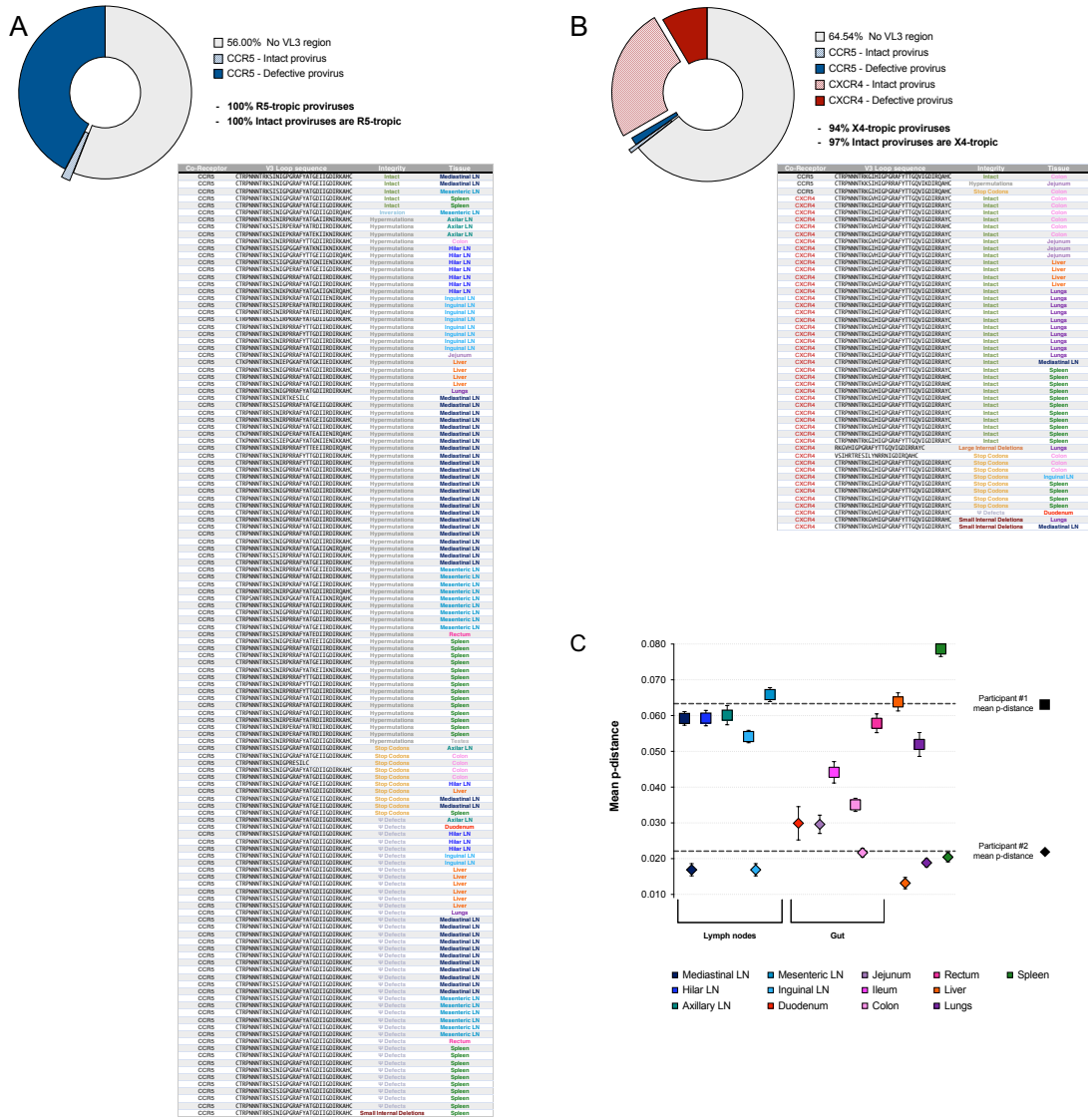


Figure S4: Predicted tropism and diversity of persistent proviruses (A and B) Envelope sequences were used to predict the proportions of CCR5- (blue) and CXCR4-tropic (red) proviruses in Participants #1 and #2. Intact proviruses (hatched colors) and defective provirus (solid colors) are shown. Geno-to-pheno co-receptor predictions based on the V3 loop amino acid sequences, tissue localizations and integrity of proviruses are indicated in the tables. **(C)** Average Tamura Nei p-distances are represented for each tissue and are color-coded. Only one HIV genome was included for every locally expanded proviral sequences. Squares and diamonds represent distances for Participants #1 and #2, respectively. Tissues from which 5 HIV genomes or less were obtained were excluded from this analysis. Mean p-distance of every unique proviruses from each participant are indicated by a dash line. Data are represented as mean \pm SD. LN: lymph node.

Supplemental figure 5.

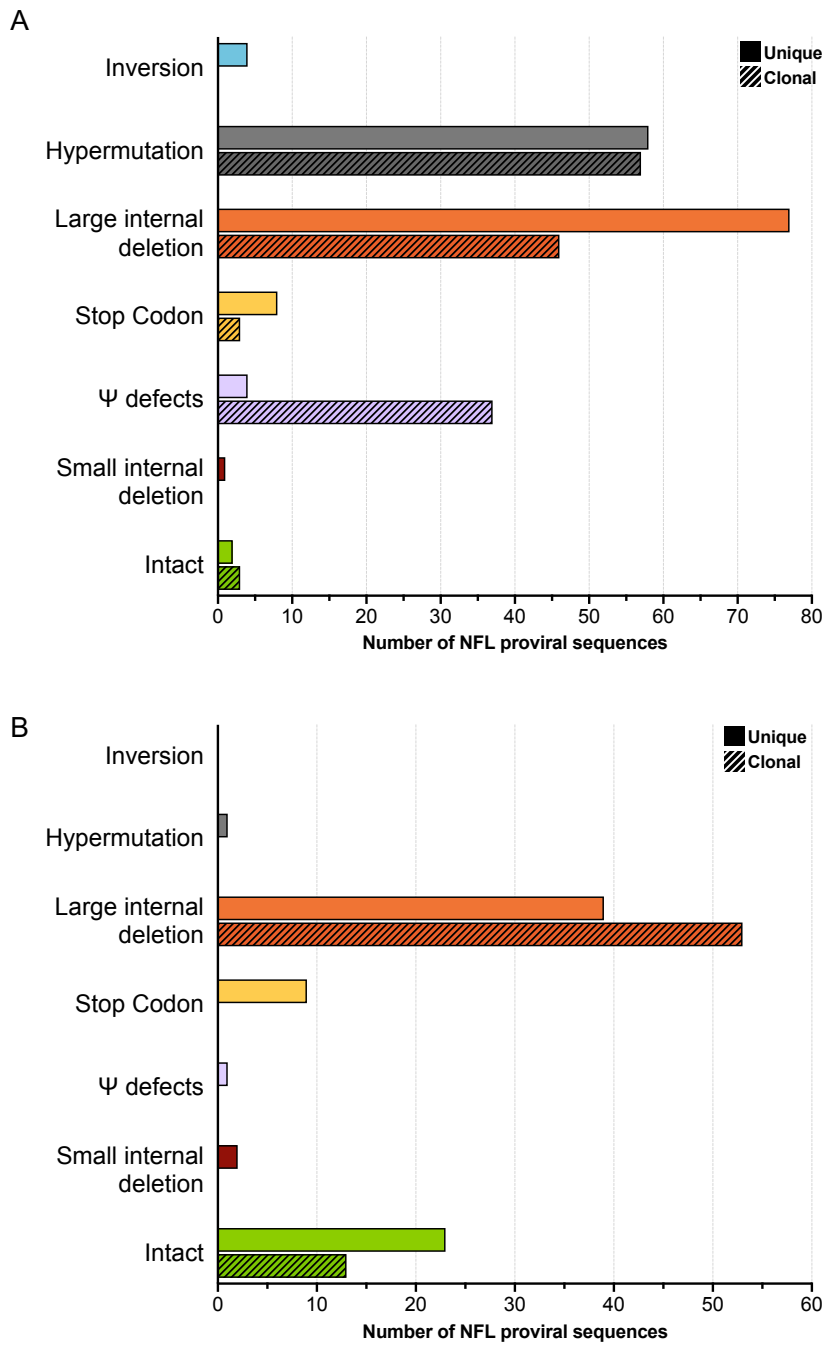


Figure S5: HIV genome integrity of clonally expanded proviruses in tissues (A and B) Number of unique (solid colors) and clonally expanded (hatched colors) sequences per integrity group for Participants #1 and #2. NFL: near full-length.

Supplemental figure 6.

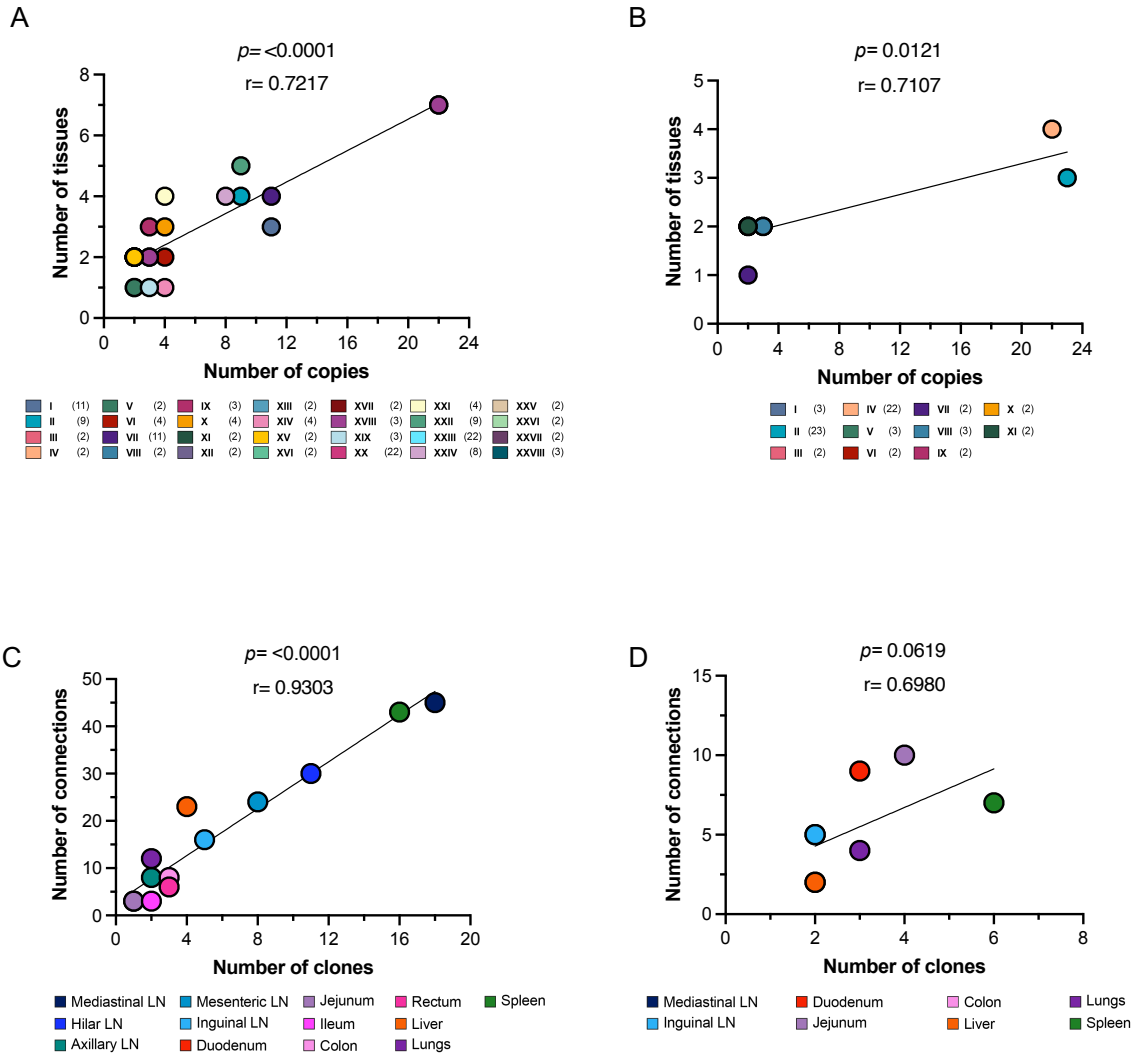


Figure S6: Associations between the number of sequences analyzed, their clonality and their distribution (A and B) Correlations between the size of an expanded clone (number of copies of identical proviruses) and the number of tissues in which this clone was found are shown for Participants #1 and #2. Dots are color-coded based on the clone ID. p-values were obtained using the Spearman two-tailed correlation test. (C and D) Correlations between the number of clones identified in a given tissue and the number of connections this tissue shares with other compartments are shown for Participants #1 and #2. Tissues are color-coded. p-values were obtained using the Spearman two-tailed correlation test. LN: lymph node.

Supplemental Table 1.

A

| Tissue | Total cells assayed for HIV DNA quantification | Total RNA (µg) assayed for HIV RNA quantification |
|----------------|--|---|
| Mediastinal LN | 9,008,271 | 20.30 |
| Hilar LN | 13,787,811 | 41.81 |
| Axillary LN | 7,242,582 | 27.53 |
| Inguinal LN | 12,445,037 | 48.18 |
| Mesenteric LN | 15,481,934 | 45.38 |
| Duodenum | 4,856,174 | 22.15 |
| Jejunum | 6,738,435 | 12.04 |
| Ileum | 956,706 | 14.37 |
| Colon | 5,856,118 | 16.96 |
| Rectum | 3,261,040 | 14.80 |
| Liver | 14,355,650 | 18.84 |
| Testes | 14,622,810 | 18.40 |
| Lungs | 10,963,043 | 5.24 |
| Spleen | 53,926,751 | 20.06 |
| Brain | 18,664,840 | 4.08 |
| Total | 192,167,201 | 330.12 |

B

| Tissue | Total cells assayed for HIV DNA quantification | Total RNA (µg) assayed for HIV RNA quantification |
|----------------|--|---|
| Mediastinal LN | 17,504,911 | 36.71 |
| Inguinal LN | 15,744,114 | 10.51 |
| Mesenteric LN | 15,884,652 | 3.75 |
| Duodenum | 6,110,896 | 26.36 |
| Jejunum | 790,721 | 12.40 |
| Ileum | 983,290 | 6.97 |
| Colon | 2,500,296 | 12.01 |
| Rectum | 317,851 | 10.35 |
| Liver | 834,806 | 9.95 |
| Testes | 9,304,008 | 27.02 |
| Lungs | 6,318,937 | 5.11 |
| Spleen | 4,860,161 | 2.81 |
| Brain | 18,630,048 | 23.78 |
| Spinal Cord | 395,063 | - |
| Total | 100,179,753 | 187.72 |

Table S1: Cells assayed for HIV DNA and RNA quantifications Total number of cells and RNA (µg) assayed for each tissue for (A) Participant #1 and (B) Participant #2 are indicated. LN = lymph nodes.

Supplemental Table 2.

| Compartmentalization analysis | Result | Participant | |
|---|----------------|-------------|-------|
| | | #1 | #2 |
| Overall tissue reservoirs | CC-test | 0.008 | 0.014 |
| (Dataset: all hypermutated sequences are excluded) | <i>p-value</i> | 0.311 | 0.087 |
| Overall tissue reservoirs | CC-test | 0.004 | 0.014 |
| (Dataset: all sequences included, hypermutant sites are stripped) | <i>p-value</i> | 0.377 | 0.257 |
| Intact tissue reservoir | CC-test | - | 0.039 |
| (Dataset: only genetically intact proviral sequences) | <i>p-value</i> | - | 0.182 |

CC-test = the Correlation Coefficient test

Table S2: Compartmentalization analysis The tree-bases Correlation Coefficient (CC) test was performed on three different datasets per participant. *P-values* below 0.05 are indicative of evidence of compartmentalization.

Supplemental Table 3.

| Target | Primer/Probe Name | Amplicon length | HXB2 position | Sequence |
|--|-------------------|-----------------|---------------|--|
| HIV DNA/RNA quantification PCR1 | | | | |
| HIV | ULF1 | 360 bp | 452-471 | 5'-ATGCCACGTAAGCGAAACTCTGGGTCTCTCTDGTAGAC-3' |
| | UR1 | | 775-793 | 5'-CCATCTCTCTCCTTCTAGC-3' |
| HIV DNA/RNA quantification PCR2 | | | | |
| HIV | LambdaT | 169 bp | | 5'-ATGCCACGTAAGCGAAACT-3' |
| | UR2 | | 583-602 | 5'-CTGAGGGATCTCTAGTTACC-3' |
| | UHIV FamZen | | | 5'-/56-FAM/ CACTCAAGG/ZEN/CAAGCTTTATTGAGGC/3IABkFQ/-3' |
| CD3 DNA quantification PCR1 | | | | |
| CD3 | HCD3-out-5' | 400 bp | | 5'-ACTGACATGGAACAGGGGAAG-3' |
| | HCD3-out-3' | | | 5'-CCAGCTCTGAAGTAGGGAACATAT-3' |
| CD3 DNA quantification PCR2 | | | | |
| CD3 | HCD3-in-5' | 264 bp | | 5'-GGCTATCATTCTTCTTCAAGGT-3' |
| | HCD3-in-3' | | | 5'-CCTCTCTTCAGCCATTTAAGTA-3' |
| | CD3 FamZen | | | 5'-/56-FAM/ AGCAGAGAA/ZEN/CAGTTAAGAGCCTCCAT/3IABkFQ/-3' |
| HIV near-full length PCR1 | | | | |
| HIV | 638F | 9,049 bp | 638-666 | 5'-GCGCCCGAACAGGGACYTGAAARCGAAAG-3' |
| | BLOuterR | | 9,662-9,686 | 5'-TGAGGGATCTCTAGTTACCAGAGTC-3' |
| HIV near-full length PCR2 | | | | |
| HIV | 263F | 9,025 bp | 651-672 | 5-'GACCTGAAAGCGAAAGGGAAAC-3' |
| | 280R | | 9,650-9,676 | 5'-CTAGTTACCAGAGTCACACAACAGACG-3' |

bp = base pairs

Table S3: Primers and probes sequences List of primers and probes used for HIV RNA/DNA quantification, CD3 DNA quantification, and HIV near full-length PCR amplification. bp = base pairs.

Chapitre 4 – Discussion et perspectives

Dans le chapitre III de son traité de stratégie militaire « L'Art de la Guerre », Sun Tzu conclut que : « Connais ton ennemi et connais-toi toi-même; eussiez-vous cent guerres à soutenir, cent fois vous serez victorieux » (Tzu, 2018). Cette approche peut se résumer ainsi: la meilleure tactique pour vaincre son opposant est d'identifier ses faiblesses. Ceci trouve écho dans les efforts déployés pour développer des traitements curatifs contre l'infection au VIH. Chaque nouvelle information obtenue permet d'affiner le portrait que nous avons de cette pathologie et du virus qui la cause. En ce qui concerne les réservoirs de cellules infectées et latentes qui persistent malgré des années de ART, notre degré de compréhension des mécanismes virologiques et immunitaires responsables de leur persistance demeure relativement faible.

Le cœur même de cette thèse se concentre sur la caractérisation génotypique des réservoirs du VIH. Ce travail de recherche a de particulier que les données d'intégrité des provirus qui persistent sont combinées à leur potentiel d'inductibilité, leur répartition anatomique, leur clonalité et/ou aux caractéristiques des cellules dans lesquelles ils se trouvent. Nous avons développé une approche d'amplification et de séquençage de génomes viraux quasi complet, éliminant toute étape de reconstruction, et l'avons optimisé pour que cette PCR soit assez sensible pour amplifier une seule copie de VIH provenant d'une unique cellule triée. Le volet tri de cellule individuelle de notre technique a permis de démontrer l'efficacité (71%) et la fidélité (97%) de notre approche, deux aspects récemment mis en doute concernant les autres méthodes d'amplification et de séquençage des provirus quasi complet (White et al., 2022).

| Publication | Nom de la méthode | Préparation de l'ADN | Enzyme utilisée | PCR1 // PCR externe | | | PCR2 // PCR(s) interne(s) | | | Méthode de détection | | |
|--------------------------------|---|--|--|--|----------------------|-----------------|--|--------------------|-----------------|----------------------|--------------------|-----------|
| | | | | Cycles | Amorces | Position (HXB2) | Cycles | Amorces | Position (HXB2) | | | |
| Ho et al., Cell 2013 | nFGS | Extraction d'ADN Gentra Puregene Cell Kit (QIAGEN) | Platinum Taq High Fidelity Polymerase (Invitrogen) | 50 (hybridation de 30 sec en <u>touchdown</u> , de 64°C à 55°C) | BLOuterF BLOuterR | 623-9686 | 45 (hybridation de 30 sec en <u>touchdown</u> , de 64°C à 55°C) | 275F 3InOut | 646-5094 | Gel | | |
| Bruner et al., Nat Med 2016 | nFGS | Extraction d'ADN Qiagen Gentra Purgene Cell Kit A | Platinum Taq HiFi Polymerase (Life Technologies) | 30 (hybridation de 30 sec en <u>touchdown</u> , de 64°C à 55°C) | | | | DNA F2 BLInnerR | 682-9632 | | 275F 3InOut | 646-5094 |
| | | | | | | | | | | | 263F 3AccOut | 651-6443 |
| | | | | | | | | | | | 5InOut BLInnerR | 3248-9632 |
| Imamichi et al., PNAS 2016 | 5' LTR-to-3' LTR single genome amplification and direct amplicon sequencing | Extraction d'ADN PicoPure kit (Thermo Fisher Scientific) | KAPA HiFi HotStart (KAPA Biosystems) | 30 (hybridation de 30 sec en <u>touchdown</u> , de 64°C à 55°C) | | | | 5AccOut 280R | 4899-9676 | | 275F 280R | 646-9676 |
| | | | | | | | | | | | | |
| Heiner et al., Cell Rep 2017 | FLIPS | Cell lysis Lysis buffer (10 mM Tris-HCl [Invitrogen], 0.5% Nonidet P-40, 0.5% Tween-20 [Sigma], and 0.3 mg/mL proteinase K [Ambion]) | Platinum Taq High Fidelity (Invitrogen) | 40 (hybridation de 30 sec en <u>touchdown</u> , de 64°C à 55°C) | | | | 275F 280R | 646-9676 | | | |
| Lee et al., J Clin Invest 2017 | Full Length HIV-1 Sequencing (FLIP-seq) | Extraction d'ADN QIAGEN DNeasy Blood & Tissue or FFPE Tissue kit | Invitrogen Platinum Taq | 30 (hybridation de 30 sec en touchdown, de 64°C à 55°C) | 638F BLInnerR | 638-9632 | | | | | | |
| Gaebler et al., J Exp Med 2019 | Q4PCR | Extraction d'ADN Gentra Puregene Cell Kit (Qiagen) | Platinum Taq High Fidelity polymerase (Thermo Fisher Scientific) | 50 (hybridation de 30 sec en <u>touchdown</u> , de 64°C à 55°C) | 275F 280R | 646-9676 | Q4PCR | | | | | |
| Dufour et al. Nat Comm 2023 | NFL PCR | DNA lysis (Direct PCR Lysis buffer & proteinase K) | Invitrogen Platinum SuperFi II MasterMix (Invitrogen) | 25 | 638F BLOuterR | 638-9686 | 30 | 263F 280R | 651-9676 | Gel | | |

Tableau 4. – Les approches NFL PCR du VIH et leur méthodologie

Notre méthode de NFL PCR pour la cellule unique diffère des autres méthodes d'amplification du génome complet de VIH. Les points similaires sont représentés en gras.

D'importantes différences méthodologiques entre notre technique et celles utilisées dans d'autres études sont à mentionner : d'abord, l'ADN est préparé par une étape de lyse, plutôt que par une extraction d'ADN, ce qui permet de conserver de longs fragments d'ADN; les amorces ont été adaptées de protocoles antécédents, avec l'ajout de nucléotides dégénérés pour maximiser l'appariement; une nouvelle enzyme de PCR à très haute-fidélité et avec un meilleur rendement pour les longs fragments a été utilisée; l'hybridation des amorces se fait à température constante; la PCR2 est également effectuée en un seul long fragment (Tableau 4.). Finalement, nous avons utilisé la plateforme de séquençage de nouvelle génération PacBio, qui permet d'obtenir des séquences de longs fragments en un seul morceau, éliminant dès lors toutes étapes de reconstruction *in silico*. Cette approche nous a permis de caractériser les réservoirs de cellules latentes inductibles et compétentes pour la traduction, ainsi que ceux qui persistent dans les tissus profonds. Les principaux résultats sont détaillés et discutés dans la section suivante.

4.1. La caractérisation génotypique des réservoirs du VIH

4.1.1. L'intégrité des réservoirs du VIH qui persistent

L'objectif principal de cette thèse est d'évaluer l'intégrité des réservoirs du VIH qui persistent chez les PVVIH qui prennent des ART depuis des années. Le premier objectif a été de déterminer la proportion de génomes viraux qui sont intacts, puisque ce sont eux qui peuvent produire de nouvelles particules virales infectieuses et mener au rebond de la charge virale.

De façon surprenante, mais conformément à ce qui a été rapporté par Cole *et coll.* entre temps (Cole et al., 2021), les cellules portant un provirus inductible et compétent pour la traduction de la capsid virale ne sont pas enrichies en génome intact, ceux-ci ne représentant que 4 % de tous les provirus retrouvés dans les cellules p24+ (Dufour, Richard, et al., 2023). Les données de ces deux études basées sur le HIV-Flow soulignent que la production de protéine virale, du moins la première protéine encodée par le génome du VIH (Gag), n'est pas un marqueur du réservoir intact et potentiellement compétent pour la réplication. D'autre part, nous avons noté la présence de provirus intacts au sein de différents compartiments anatomiques chez l'humain. Bien que ces génomes intacts soient surtout présents dans les ganglions lymphatiques, ce qui est attendu étant

donné que les cellules T_{FH} retrouvées principalement dans ces tissus sont connues pour être un réservoir compétent pour la réplication (Banga et al., 2016), ils ont également été détectés dans la rate, un autre organe lymphoïde, mais aussi dans les poumons, le foie et des portions du système digestif (Dufour, Ruiz, et al., 2023). Ces organes sont donc tous des sources potentielles du rebond de charge virale lors de TI.

Bien que nous ayons étudié les tissus de seulement 2 participants, le profil d'intégrité des réservoirs semble refléter l'historique clinique. Dans notre étude sur les échantillons *post mortem*, le premier participant présente une proportion anormalement élevée de génomes du VIH hypermutés, accumulation résultant fort probablement du fait qu'il fut plus de 10 ans sans contrôle de sa virémie. En effet, les hypermutations sont causées par APOBEC3G, un facteur de restriction incorporé dans les virions en formation (Sheehy et al., 2002) qui induit des mutations G→A lors de la transcription inverse (Harris et al., 2003). Ainsi, les hypermutations ne se produisent que dans un contexte de réplication virale active. Ce constat renforce l'idée que les réservoirs du VIH qui persistent sont archivés au moment de l'initiation des ART (Abrahams et al., 2019).

Ce participant ne présentait que 2 % de provirus intacts, une proportion inférieure à ce qui a été observé dans le sang de la majorité des PVVIH sous ART ([3,9%] Dufour, Richard, et al., 2023; [5%] Hiener et al., 2017; [12%] Ho et al., 2013; [5%] Lee et al., 2017). Ceci pourrait expliquer en partie pourquoi cette personne n'a pas évolué vers le stade SIDA malgré une décennie de charge virale incontrôlée : la rareté des virus intacts limiterait la production de nouveaux virions infectieux, permettant le maintien d'un bon taux de CD4 pendant toutes ses années. Il sera toutefois impossible de confirmer cette hypothèse puisqu'aucun prélèvement avant l'initiation des ART n'a été effectué. De plus, les provirus de cette PVVIH présentent d'autres caractéristiques qui pourraient expliquer sa progression plus lente, comme une plus grande diversité génotypique (Delwart et al., 1997) et une plus grande proportion de substitutions nucléotidiques non synonymes (Lukashov et al., 1995). À l'opposé, les réservoirs anatomiques de la 2^e PVVIH de cette étude sont composés d'un quart de provirus intacts, une proportion supérieure à la moyenne. Fait intéressant, la plupart de ces provirus présentent un tropisme X4. L'interaction de CXCR4 avec son ligand, CXCL12, est connue pour jouer un rôle majeur dans le trafic des cellules T vers la

moelle osseuse et le thymus (revu dans Teixido et al., 2018), mais est également impliquée dans de nombreuses métastases cancéreuses vers des organes exprimant CXCL12 (revu dans Domanska et al., 2013). Ainsi, le tropisme X4 des génomes viraux chez ce participant pourrait avoir favorisé une meilleure persistance dans les tissus. Grâce au séquençage des génomes viraux quasi complets, il est ainsi possible de faire une caractérisation détaillée du profil d'intégrité du réservoir chez une PVVIH, et d'obtenir, en plus de la fréquence des provirus intacts, plusieurs informations comme l'utilisation du corécepteur et la diversité génotypique.

4.1.2. L'hétérogénéité des cellules infectées qui persistent au fil des années de ART

La deuxième observation qui ressort des résultats présentés dans cette thèse est l'hétérogénéité des cellules infectées qui persistent pendant les ART. Depuis des années, différents groupes sont en quête d'un marqueur, ou d'une combinaison de marqueurs, qui permettraient d'identifier précisément, et donc éventuellement de cibler, les cellules du réservoir. Néanmoins, plusieurs études font état d'une hétérogénéité des réservoirs : celle-ci est autant interindividuelle (Neidleman et al., 2020) que présente au sein du même individu (Sun et al., 2023; Wu et al., 2023). En effet, dans l'étude de Wu *et coll.*, aucun des 154 marqueurs utilisés ne permet de distinguer les cellules du réservoir des cellules saines. Cette mosaïque phénotypique confère aux diverses cellules du réservoir des aptitudes variées, que ce soit concernant la survie ou la permissivité à la transcription (Galvez et al., 2021). Une hétérogénéité est également observée au niveau du transcriptome des cellules infectées, qu'elles aient un provirus transcriptionnellement actif (Collora et al., 2022) ou non (Clark et al., 2023).

Un autre constat important de notre étude qui combine génotype viral et phénotype cellulaire est que les cellules qui constituent un clone de lymphocytes T CD4+ sont phénotypiquement distincts. Cette observation confirme la diversité dans le transcriptome des clones infectés rapporté par Weymar *et coll.* (Weymar et al., 2022), et la différence de réactivation transcriptionnelle des provirus clonaux identifiée dans l'étude de Sannier *et coll.*, à laquelle j'ai contribué (Sannier et al., 2021). Cette dernière étude démontre que la variabilité du réservoir se

remarque jusque dans le potentiel de réactivation des différents LRA sur des cellules infectées (Sannier et al., 2021).

Ces données soulignant la diversité des cellules du réservoir ont une implication directe dans le développement de stratégie curative : en plus de l'absence de marqueur cellulaire spécifique aux cellules infectées, la pluralité des lymphocytes T CD4⁺ du réservoir fait en sorte qu'il faudra élaborer une approche thérapeutique qui vise plusieurs cibles simultanément.

À l'instar d'autres études (Fromentin et al., 2016; Hiener et al., 2017; Horsburgh et al., 2020; Pardons, Baxter, et al., 2019), nous avons démontré un enrichissement, c'est-à-dire une fréquence plus élevée, des provirus inducibles et compétents pour la traduction parmi les cellules T CD4⁺ mémoires exprimant PD-1, TIGIT, ou HLA-DR et $\alpha 4\beta 1$. De façon intéressante, l'expression d' $\alpha 4\beta 1$ /VLA-4 est maintenue dans le temps à la surface des cellules portant des provirus intacts, bien qu'il soit nécessaire de confirmer cette observation dans une étude longitudinale. D'autre part, les provirus compétents pour la réplication sont fortement enrichis parmi les cellules T CD4⁺ mémoires exprimant de forts niveaux de VLA-4 après des années de ART. L'intégrine VLA-4 serait donc le premier marqueur qui permette d'enrichir spécifiquement pour les cellules potentiellement responsables du rebond de la charge virale.

4.1.3. L'importance de la clonalité dans le maintien des réservoirs

La troisième observation majeure de ce travail est la contribution importante de l'expansion clonale dans le maintien des réservoirs de cellules infectées. Que ce soit parmi les cellules p24⁺, les p24⁻ (Dufour, Richard, et al., 2023) ou les cellules infectées qui persistent dans les tissus profonds (Dufour, Ruiz, et al., 2023), les réservoirs chez les PVVIH sous ART sont constitués approximativement à 50 % de provirus en multiples copies, et cette clonalité est observée autant pour les génomes défectifs qu'intacts. Il est à noter que comme d'autres équipes (Horsburgh et al., 2020; Lee et al., 2017; Pinzone et al., 2019), nous évaluons la clonalité sur la base de la séquence provirale quasi complète dans le contexte de PVVIH sous ART depuis plusieurs années : compte tenu du taux d'erreur élevé de la transcriptase inverse, la probabilité que des provirus identiques proviennent de deux infections distinctes est négligeable. Il est donc

convenu dans ce cas que le séquençage quasi complet du VIH est un biomarqueur de l'expansion des cellules T, au même titre que le site d'intégration et la séquence du TCR.

Il a déjà été rapporté que la majorité des cellules du réservoir ont un historique de prolifération (Reeves et al., 2018). La présence de multiples clones, de tailles variées, tend à démontrer que cette prolifération est causée par des stimulations antigéniques via le TCR. Ceci est appuyé par les études démontrant que le réservoir du VIH est composé de cellules T CD4⁺ spécifiques pour des antigènes communs tels que CMV, influenza, EBV et *M. tuberculosis* (Collora et al., 2022; Gantner et al., 2020; Simonetti et al., 2021). Fait intéressant, la stimulation antigénique, contrairement à la prolifération homéostatique (Bosque et al., 2011; Z. Wang et al., 2018), induit généralement la transcription virale (Bailey et al., 2006). Cette réactivation devrait théoriquement entraîner l'élimination des cellules infectées auparavant latentes, pourtant ces clones persistent. Une piste d'explication pour ce phénomène peut provenir de l'hétérogénéité des cellules réservoirs. En premier lieu, toutes les cellules d'un même clone pourraient ne pas être réactivées simultanément, ce qui favoriserait la survie des quelques représentantes traductionnellement silencieuses (Dufour, Richard, et al., 2023). De plus, les sous-populations mémoires ne sont pas équivalentes quant à leur permissivité transcriptionnelle (Sannier et al., 2021). Ainsi les provirus clonaux intégrés dans les T_{CM}, des cellules moins sensibles aux LRA (Pardons, Fromentin, et al., 2019), auront un avantage de survie par rapport à ceux retrouvés dans les T_{EM}. Une autre explication pourrait venir du fait que certains larges clones de VIH, transcriptionnellement actifs, sont maintenus simplement parce qu'ils sont intégrés dans des oncogènes. Ainsi, l'élimination par cytotoxicité de ces clones transcriptionnellement actifs serait atténuée par leur forte prolifération (Einkauf et al., 2022). Finalement, les cellules infectées clonales qui persistent dans le temps semblent avoir un avantage de survie et de résistance à l'élimination grâce à l'expression de protéines anti-cytotoxiques, comme la serpinB9, ou anti-apoptotiques, comme BCL-2 (Collora et al., 2022; Ren et al., 2020).

Puisque le rôle des expansions clonales dans le maintien des réservoirs est désormais bien établi, il est intéressant d'évaluer le stade de l'infection au cours duquel ce phénomène se produit. Ce sont des questions que nous avons abordées dans deux études auxquelles j'ai participé. À l'aide d'échantillons de PBMCs et de ganglions lymphatiques de PVVIH en primo-infection de la cohorte

thaïlandaise RV254, mon collègue Pierre Gantner a montré que, durant les stades Fiebig I à IV, le répertoire TCR des cellules productivement infectées est extrêmement variable, suggérant que la dissémination initiale du VIH est indépendante de l'expansion clonale (Gantner et al., 2023). Autre fait intéressant, si l'on considère que la dissémination initiale du VIH dans l'organisme se produit avant l'expansion clonale des cellules infectées, le fait qu'on retrouve des copies de génomes viraux quasi complets identiques dans plusieurs organes chez des PVVIH sous ART (Dufour, Ruiz, et al., 2023) implique que les cellules composant les réservoirs viraux recirculent entre les différents sites anatomiques après leur expansion.

La deuxième étude collaborative, menée par ma collègue Marta Massanella (Massanella et al., en préparation), s'est intéressée à l'évolution des réservoirs chez les enfants infectés par transmission verticale (c'est-à-dire la transmission de la mère à l'enfant durant la grossesse, au moment de l'accouchement ou durant l'allaitement) et rapidement mis sous ART dans les 6 premiers mois de vie (cohortes thaïlandaises HIVNAT209 et HIVNAT94). Grâce à la caractérisation génétique des réservoirs dans des PBMCs prélevées avant les ART, après 2, 3 et plus de 3 ans de ART, nous avons révélé que les expansions clonales sont rares, et limitées lorsque présentes, avant l'initiation des traitements. Par contre, bien que ces PVVIH aient la particularité d'avoir un système immunitaire plus jeune et composé essentiellement de lymphocytes T CD4+ naïfs, les réservoirs de VIH sont rapidement constitués à 50 % d'expansion clonale dès 2 ans de ART, et cette proportion reste stable dans le temps. Il s'agit d'une proportion comparable à celle observée chez les adultes après 4 à 21 ans de ART (Dufour, Richard, et al., 2023; Dufour, Ruiz, et al., 2023). L'ensemble de ces travaux suggèrent que, chez les enfants comme chez les adultes, les expansions clonales ne participent que faiblement à la dissémination initiale du virus, mais contribuent fortement à la persistance des réservoirs au cours des ART.

Quel est le lien entre la diversité phénotypique des réservoirs et leur clonalité? Nous avons démontré que les provirus clonaux se trouvent dans des cellules T CD4+ phénotypiquement différentes. Cela suggère que même si le réservoir tend à devenir moins diversifié génotypiquement avec le temps, sa diversité phénotypique s'amplifie. De plus, au cours des ART, l'augmentation de la clonalité des réservoirs du VIH serait concomitante à la perte de la diversité virale (Cho et al., 2022) et du répertoire TCR (Boritz et al., 2016). Ceci pourrait s'expliquer par le

fait qu'un lymphocyte T CD4+ mémoire qui est stimulé via son TCR par son antigène possède une certaine plasticité qui lui permet de se différencier en cellules T possédant des fonctions effectrices variables. Le réservoir de VIH retrouvé parmi des T CD4+ spécifiques à des antigènes communs et/ou chroniques sera ainsi stimulé plusieurs fois au fil des années, favorisant la diversification phénotypique et fonctionnelle, et la perte de la diversité provirale. Ces résultats suggèrent donc que le traitement des infections chroniques affectant les PVVIH, comme le CMV, pourrait limiter la diversification phénotypique du réservoir.

4.1.4. La compartimentalisation anatomique des génomes viraux

L'accès à plusieurs réservoirs anatomiques de deux PVVIH nous a offert la possibilité d'investiguer plus en profondeur l'hypothèse de la compartimentalisation des réservoirs du VIH. Le travail de Chaillon *et coll.* avait déjà établi que des cellules infectées pouvaient être détectées dans tous les organes étudiés, et l'analyse des séquences d'*env* révélait la présence de plusieurs provirus identiques parmi plusieurs tissus (Chaillon et al., 2020). Cependant, le séquençage sous-génomique peut surestimer la proportion et la taille des clones (Patro et al., 2019). Notre travail a fourni des informations supplémentaires aux observations du « Last Gift Study », en confirmant d'une part la présence de réservoirs dans tous les tissus analysés, puis en évaluant la clonalité d'une manière plus précise grâce au séquençage quasi complet de génomes viraux. En effet, nous avons observé que les cellules infectées qui composent une expansion clonale sont fréquemment retrouvées dans plus d'un site anatomique, et ce, sans que ces organes soient biologiquement interreliés (par exemple : entre des tissus lymphoïdes et les poumons) (Dufour, Ruiz, et al., 2023). Nous avons également observé que deux compartiments anatomiques distincts, quels qu'ils soient, partagent au minimum un clone proviral. Cette distribution diversifiée des cellules clonales a été rapportée dans une étude non-VIH sur le répertoire TCR des cellules T CD4+ et CD8+, qui démontrait qu'un même clone peut être identifié autant chez des T_{EM} que des T_{RM}, et que ces clones sont à la fois distribués au sein d'un même tissu et partagés dans plusieurs sites anatomiques (Miron et al., 2021).

Nos résultats, qui se basent sur l'analyse de plus de 8 tissus anatomiques, tendent à démontrer une absence de compartimentalisation des réservoirs pendant les ART, conformément à des

études antérieures effectuées sur un moins grand nombre de sites anatomiques (Huyveneers et al., 2022; Imamichi et al., 2011; Lorenzo-Redondo et al., 2016; Wu et al., 2020). Cependant, par manque de matériel, nous n'avons pu obtenir de génomes proviraux du cerveau, et un seul provenant des testicules, tous deux potentiellement des réservoirs compartimentés chez l'humain (Brese et al., 2018; Miller et al., 2019; Wang et al., 2022). Nous ne pouvons pas non plus extrapoler sur une potentielle compartimentalisation entre les lymphocytes T_M en circulation et les cellules réservoirs des tissus, puisque des PBMCs n'ont pas été collectées juste avant le décès des deux PVVIH.

4.1.5. L'implication des provirus défectifs

Nous avons observé que malgré leur grande taille (moyenne = 8 945 pb), la majorité des provirus inductibles et compétents pour la traduction présentent des défauts génétiques qui devraient, en théorie, empêcher leur réplication. Ce constat va à l'encontre de ce qui a longtemps été proposé, c'est-à-dire que les provirus défectifs sont incapables de produire des transcrits et des protéines virales, et ne sont que des reliques d'infections du passé (revu dans Siliciano & Siliciano, 2021). Il est maintenant bien établi que les provirus défectifs peuvent produire des transcrits viraux (Einkauf et al., 2022; Imamichi et al., 2016; Pollack et al., 2017; Sannier et al., 2021). Dans notre étude sur les cellules infectées exprimant la capsid virale, nous avons poussé l'analyse génétique en évaluant individuellement l'intégrité des neuf régions codantes (ORFs) et des deux régions régulatrices (Ψ et RRE) du génome viral. Nous avons observé que ces provirus défectifs et capables de produire la p24 présentent des défauts dans 1 à 5 régions du génome. Il est cependant important de noter que notre approche ne nous permet pas d'établir si ces provirus défectifs peuvent produire d'autres protéines virales, tel Tat pour favoriser la transcription.

Ainsi, bien que les provirus défectifs soient généralement exclus de ce qu'on nomme « les réservoirs compétents pour la réplication », ils ne sont pas à ignorer pour autant. Leur capacité, désormais démontrée, à produire des transcrits viraux et parfois même une protéine virale, suggère qu'ils sont fort probablement impliqués dans l'activation immunitaire soutenue et l'inflammation chronique présentes chez les PVVIH (revu dans Kuniholm et al., 2022; Massanella

et al., 2016). Récemment, des génomes de VIH présentant un défaut dans le locus Ψ ont même été rapportés comme étant responsables de la virémie non suppressive détectée, malgré l'absence de résistance aux antirétroviraux, chez certaines PVVIH sous ART depuis des années (White et al., 2023). Un mystère subsiste néanmoins : il était convenu que les provirus défectifs, totalement silencieux, s'accumulaient avec le temps puisqu'ils n'étaient pas reconnus par le système immunitaire, en raison de l'absence d'antigènes viraux présentés par la cellule infectée. Puisque certains d'entre eux sont compétents pour la transcription et/ou la traduction, le mécanisme qui fait en sorte que ces génomes ne sont pas éliminés au fil de temps reste à découvrir. Tel que suggéré par Cole *et coll.*, les provirus défectifs inductibles et compétents pour la traduction de la p24 sont possiblement maintenus du fait qu'ils sont soit intégrés à l'intérieur de gènes associés à la prolifération cellulaire (principalement *STAT5B*), soit parce qu'ils sont retrouvés au sein de lymphocytes T CD4+ mémoires spécifiques à des antigènes communs (CMV, *influenza* et *Mycobacterium tuberculosis*) (Cole et al., 2021). De plus, les provirus dont le gène *nef* est intact sont également préférentiellement maintenus, puisque cette protéine virale entraîne une baisse d'expression du CMH de classe I, empêchant ainsi la reconnaissance de la cellule infectée par les lymphocytes T cytotoxiques (Duette et al., 2022). D'autres études seront néanmoins nécessaires pour déterminer tous les mécanismes faisant en sorte que les provirus produisant des transcrits et des protéines du VIH peuvent échapper à la pression immunitaire.

4.1.6. Évaluer l'inductibilité des réservoirs

Un des aspects rarement évalués dans les approches de séquençage de provirus quasi pleine longueur des réservoirs du VIH est leur inductibilité, c'est-à-dire leur capacité à réactiver la transcription virale à la suite d'un stimulus. Mesurer cette faculté à sortir de l'état de latence est primordial lorsqu'on cherche à identifier les cellules responsables du rebond de la charge virale. Les données recueillies durant cette thèse démontrent que la majorité des provirus inductibles et capable de produire la protéine p24 sont défectifs (Figure 24.). À l'opposé, seule une fraction des provirus intacts sont capables de se réactiver, et de ce nombre, une minorité sera en mesure de produire de nouvelles particules virales infectieuses. Ceci peut s'expliquer par différents blocages observés au niveau des processus de transcription et d'élongation des gènes viraux (Yukl et al., 2018), blocages qui ne sont pas nécessairement causés par des défauts au

niveau du génome proviral. En d'autres termes, mesurer séparément l'inductibilité et l'intégrité des réservoirs du VIH qui persistent surestimerà, dans les deux cas, la taille du réservoir « réel », compétent pour la réplication.

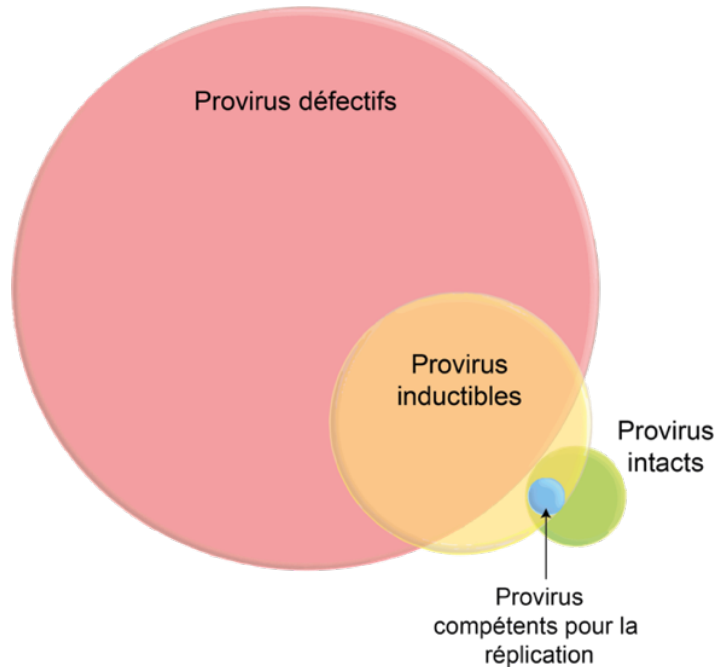


Figure 23. – L'inductibilité des réservoirs en fonction de l'intégrité provirale
Représentation schématisée (la taille des cercles est arbitraire pour imaginer le propos) des provirus étant à la fois intacts et capables de se réactiver.

Puisque des génomes viraux identiques sont retrouvés simultanément dans les populations cellulaires réactivées (transcriptionnellement (Sannier et al., 2021) et traductionnellement (Dufour, Richard, et al., 2023)) ou non, l'inductibilité du VIH ne dépend pas exclusivement de sa séquence provirale. Cette différence d'inductibilité est fort probablement causée par un environnement cellulaire plus ou moins propice à la transcription. Ainsi, la non inductibilité des provirus intacts peut s'expliquer soit par un environnement cellulaire favorisant la latence (Cohn et al., 2018; Cole et al., 2021), soit par le fait que ces provirus sont intégrés dans des régions chromosomiques associées à la latence profonde (Einkauf et al., 2019; Lian et al., 2021). La distinction entre ces deux mécanismes est essentielle au développement d'approches curatives. En effet, les provirus intacts dont l'inductibilité est réprimée par leurs localisations dans l'ADN

cellulaire seront fort probablement éternellement latents. Ce réservoir de VIH génétiquement intacts, mais réfractaires à l'activation *in vitro* a déjà été rapporté chez les contrôleurs élites (Lian et al., 2021) et chez les PVVIH adultes ayant initié les ART durant la primo-infection (Gantner et al., 2023). Les données obtenues dans l'étude à paraître de ma collègue (Massanella et al., en préparation) chez les enfants infectés par transmission verticale et débutant ART dans les premiers mois de vie vont également dans le même sens : les provirus intacts présents en grande quantité durant la phase virémique sont rapidement éliminés dans les 2 premières années de ART. Après seulement 24 mois de traitement, les rares provirus intacts de VIH sont généralement résistants à la stimulation PMA/iono *in vitro*. Ces deux cohortes de PVVIH traitées dans les semaines suivant l'infection démontrent, comme il fut rapporté précédemment (Ananworanich et al., 2016; Ananworanich et al., 2014; Hartana et al., 2022; Leyre et al., 2020; Massanella, Puthanakit, et al., 2021; Wyl et al., 2011), que l'initiation rapide des ART réduit considérablement la taille des réservoirs de VIH, et plus particulièrement du réservoir intact et inductible, potentiellement compétent pour la réplication.

Trois éléments sont à considérer face à ces résultats. Tout d'abord, les cohortes RV254 (Gantner et al., 2023), HIVNAT209 et HIVNAT94 (Massanella et al., en préparation) regroupent des PVVIH majoritairement infectées par un VIH de sous-type CRF01 (recombinant A/E), qui diffère du sous-type B habituellement retrouvé et étudié en Amérique du Nord et en Europe. Il n'est donc pas exclu que la différence de réactivation soit imputable à des distinctions génétiques propres au sous-type A/E. En effet, une variabilité dans la séquence nucléotidique, au niveau des régions U3 et R du 5'LTR, a été démontrée entre les différents sous-types de VIH, affectant autant les sites de liaisons de facteurs de transcription au promoteur que les structures dans l'ARN transcrit (Mbondji-Wonje et al., 2018). Un autre aspect est que toutes les études d'inductibilité sont effectuées *in vitro*, et principalement en effectuant un seul cycle de stimulation PMA/Ionomycine, une méthode connue pour ne pas réactiver tous les provirus inductibles (Ho et al., 2013; Hosmane et al., 2017). Finalement, l'évaluation de l'inductibilité *in vitro* ne prend pas en compte la pression immunitaire exercée *in vivo* sur les cellules latentes (revu dans Pasternak & Berkhout, 2023). Ainsi, les cellules infectées portant un provirus compétent pour la réplication détectée par qVOA pourraient être réfractaires à la réactivation *in vivo*. En effet, les provirus intacts identifiés par

séquençage NFL et qVOA sont souvent différents de ceux retrouvés dans le plasma des PVVIH ayant un rebond de la charge virale (Lu et al., 2018). Aussi, les provirus qui relancent la virémie lors de TI auraient un avantage sélectif comparativement à ceux mesurés par qVOA : ils présentent une forte résistance aux interférons de type I, des cytokines responsables de l'activation de l'immunité innée (Gondim et al., 2021). Ceci démontre bien les limitations, parfois subtiles, des expériences de réactivation *in vitro*.

4.2. Limites et perspectives

Dans cette section, nous discuterons des limites de nos approches expérimentales, et présenterons les éléments qui ouvrent de nouvelles avenues de recherche.

4.2.1. À la recherche de nouveaux marqueurs du réservoir intact

La première étude de ce travail de doctorat a permis une caractérisation du phénotype des réservoirs inductibles de provirus intacts grâce à un panel de huit protéines extracellulaires, soit CD45RA, CCR7, PD-1, TIGIT, HLA-DR, ICOS, $\alpha 4$ et $\beta 1$, toutes précédemment décrites comme des marqueurs d'enrichissement des réservoirs (Chomont et al., 2009; Fromentin et al., 2016; Pardons, Baxter, et al., 2019). Nous rapportons avoir identifié VLA-4 comme marqueur phénotypique des cellules infectées avec un provirus intact et capable de se réactiver. Avec le développement récent de nouveaux cytomètres-trieurs spectraux, il serait intéressant de refaire une étude similaire, mais d'augmenter le nombre de marqueurs dans notre panel de caractérisation. Étant donné qu'une grande partie du réservoir est composé de provirus défectifs, on ne peut exclure que des marqueurs secondaires, tels CTLA-4, CD69 ou T-bet (Neidleman et al., 2020), puissent être également préférentiellement exprimés par des cellules portant un provirus intact. De plus, de nouveaux marqueurs des réservoirs ont été identifiés depuis le début de ce travail, incluant des molécules anti-apoptotiques, Bcl-2 en particulier (Collora et al., 2022; Gantner et al., 2023; Ren et al., 2020), ainsi que d'autres molécules de point de contrôle immunitaire (BLTA et KLRG1) et certains de leurs ligands (PD-L1, le ligand de PD-1; HVEM, le ligand de BLTA; et PVR, un des ligands de TIGIT) (Sun et al., 2023), ou encore le toujours controversé CD32 (Astorga-Gamaza et al., 2022). Il serait donc intéressant de mesurer l'expression de ces molécules de surface sur les cellules du réservoir intact et compétent pour la réplication.

4.2.2. Phénotyper les réservoirs du VIH dans les tissus profonds

Bien que nous ayons cartographié génétiquement les provirus qui persistent dans une variété de tissus profonds chez deux PVVIH après des années de ART, nous n'avons pourtant pas obtenu d'information sur la nature des cellules dans lesquelles ces réservoirs anatomiques se trouvaient. La congélation des échantillons de tissus entiers ne nous a pas permis d'obtenir des cellules vivantes après décongélation, afin d'effectuer une analyse par HIV-Flow des cellules portant des provirus inducibles. Nous ne savons pas non plus quelle proportion de ces provirus était retrouvée dans des cellules myéloïdes ni quelle quantité de cellules T CD4+ infectés était des cellules T_{RM} (Wu et al., 2020). Une autre limite majeure est l'absence d'échantillons de PBMCs qui auraient pu être obtenus juste avant le décès. En effet, il aurait été fort intéressant de comparer la clonalité et l'intégrité des populations provirales entre les réservoirs circulants et anatomiques, comme cela a été fait dans des études précédentes (Chaillon et al., 2020; Wang et al., 2022). En mai 2022, une troisième PVVIH a demandé l'aide médicale à mourir des suites de problèmes hépatiques incurables et a approché le consortium CanCURE pour donner son corps à la recherche sur les réservoirs du VIH dans les mois à venir. Cette limite a été prise en compte et une prise de sang sera effectuée la veille du décès. De plus, afin de pallier au manque de matériel pour obtenir des séquences NFL du système nerveux central et de l'appareil génital, de plus grandes quantités de tissus devront également être prélevées au moment de l'autopsie. Il serait pertinent d'inclure d'autres organes rapportés comme étant des réservoirs anatomiques pour le VIH, tels la moelle osseuse (Zaikos et al., 2018) et l'appendice (Liu et al., 2022). Finalement, une caractérisation des cellules par HIV-Flow sera réalisée, en incluant un plus large panel de marqueurs. Les données découlant de ces études *post mortem* mettent en lumière la nécessité de mettre en place des biobanques de tissus profonds afin d'accroître nos connaissances sur les réservoirs anatomiques du VIH.

4.2.3. Obtenir simultanément les séquences du provirus quasi complet et du site d'intégration

Un développement majeur résultant de ce travail de recherche est l'optimisation du séquençage NFL jusqu'à pouvoir amplifier une seule copie d'ADN de VIH. Nous avons également

fait la démonstration de la grande efficacité et de la fidélité de cette approche, entre autres grâce à la plateforme PacBio qui permet le séquençage de longs amplicons. Ceci nous a permis d'évaluer la clonalité sur la base de la séquence quasi complète du génome proviral. Cependant, le meilleur marqueur de la clonalité virale reste l'analyse des sites d'intégration. De ce fait, nous avons entamé l'élaboration d'une NFL PCR qui combinerait l'amplification du génome quasi complet du VIH et de son site d'intégration en 3', grâce aux multiples séquences Alu présentes en moyenne chaque 3-6 kb dans le génome humain (Mighell et al., 1997). Jusqu'à présent, les méthodes d'analyses qui combinent NFL et sites d'intégration utilisent l'amplification du génome cellulaire complet (WGA) (Cole et al., 2021; Einkauf et al., 2019; Einkauf et al., 2022; Joseph et al., 2022; Patro et al., 2019; Simonetti et al., 2021), or cette étape préamplifie aléatoirement le génome cellulaire sous la forme de fragments d'ADN de tailles variées. Le WGA est connu pour avoir de faibles efficacité et spécificité : en effet, l'hybridation et l'amplification entre elles des amorces utilisées dans les kits de WGA diluent le pool d'ADN cible avec des amplicons non-spécifiques, et l'amplification génomique est non-homogène et ne couvre donc pas 100% du génome complet de la cellule (Pan et al., 2008). De plus, le WGA du VIH n'arrive souvent qu'à amplifier qu'un fragment du génome viral (Joseph et al., 2022). Ces méthodes ne parviennent pas à cartographier l'entière des provirus du réservoir, et génèrent un nombre non négligeable de provirus sans site d'intégration, ainsi que de sites d'intégrations sans séquence NFL de VIH. La solution idéale serait de parvenir, comme nous tentons de le faire, à avoir un seul amplicon qui couvrirait le génome du VIH quasi complet et le site d'intégration.

4.2.4. Déterminer le rôle de VLA-4 dans la persistance

Les réservoirs du VIH compétents pour la traduction, qu'ils soient défectifs ou non, sont phénotypiquement hétérogènes. En revanche, nous avons observé que les cellules infectées portant un provirus intact, inductible et compétent pour la réplication virale *in vitro* conservent une expression élevée de l'intégrine VLA-4, une glycoprotéine transmembranaire de type I composée des sous-unités $\alpha 4$ et $\beta 1$ (Woodside & Vanderslice, 2019).

VLA-4 est essentiellement exprimée à la surface des cellules hématopoïétiques, incluant les cellules cibles du VIH que sont les lymphocytes T et les cellules myéloïdes, et son expression est

maintenue chez les lymphocytes T après leur activation antigénique (Hemler et al., 1987). VLA-4 est une molécule impliquée dans le transport cellulaire et permet aux lymphocytes T activés en circulation d'adhérer aux cellules endothéliales exprimant VCAM-1, son ligand (Osborn et al., 1989), afin d'initier la diapédèse (Elices et al., 1990) (Figure 25.). VCAM-1 est principalement surexprimé par les tissus inflammés au niveau du système nerveux central (Engelhardt et al., 1995), et sur les cellules stromales de la moelle osseuse, où il permet la rétention des cellules T CD4+ mémoires (DeNucci & Shimizu, 2011). De plus, cette intégrine jouerait également un rôle dans la co-stimulation des cellules T CD4+ et CD8+ (Kim et al., 2010; Sato et al., 1995).

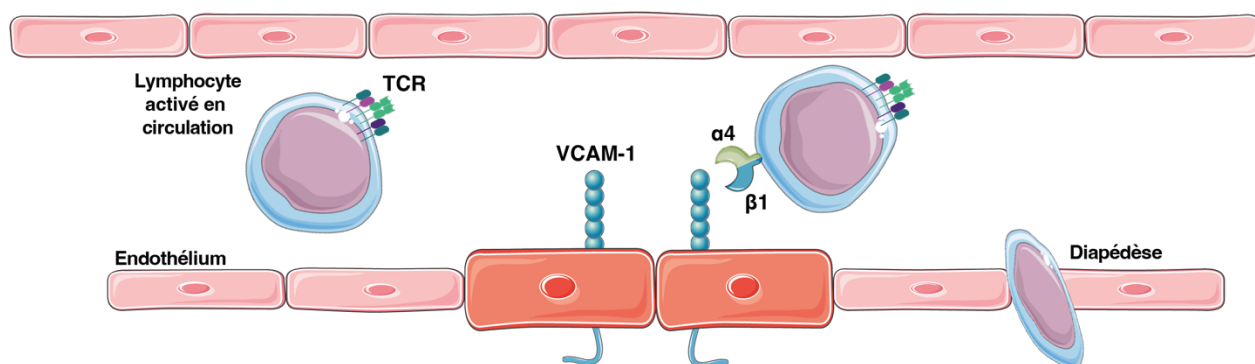


Figure 24. – Expression de VLA-4 ($\alpha4\beta1$) et de son ligand, VCAM-1

Les lymphocytes T CD4+ en circulation dans le sang expriment VLA-4 ($\alpha4\beta1$) une fois activés. Ils pourront alors s'associer au ligand VCAM-1, exprimé sur les cellules de l'endothélium en cas d'inflammation.

VLA-4 a été identifié en 1992 comme une protéine impliquée dans le recrutement des lymphocytes T au niveau du système nerveux central, et l'utilisation d'antagoniste de $\alpha4$ permettait de réduire l'inflammation associée à l'encéphalomyélite auto-immune expérimentale (EAE) dans un modèle murin pour l'étude de la sclérose en plaques (Yednock et al., 1992). En 2006, le natalizumab, un anticorps monoclonal thérapeutique bloquant l'interaction entre la sous-unité $\alpha4$ et VCAM-1, est évalué dans un essai clinique de phase III et démontre une efficacité à ralentir la progression de la sclérose en plaques (Polman et al., 2006). Cependant, l'utilisation de natalizumab à long terme est associée à un risque accru de développer une leucoencéphalopathie multifocale progressive (PML) (Yousry et al., 2006), qui est causée par la

réactivation du virus John Cunningham (JC) (Clifford et al., 2010). Depuis, d'autres antagonistes d' $\alpha 4$, comme le carotegrast methyl (Dhillon, 2022), ou de la combinaison $\alpha 4\beta 1$, comme le BIO1211 (Ramroodi et al., 2015), sont étudiés afin d'obtenir le même effet thérapeutique du natalizumab sans l'apparition de PML.

Puisque nos résultats indiquent que cette intégrine est fortement exprimée sur les cellules T CD4+ en circulation composant le réservoir compétent pour la réplication, il est primordial de comprendre le rôle de VLA-4 dans l'établissement et/ou le maintien des réservoirs du VIH durant les ART. Serait-il possible que l'expression de VLA-4 permette aux cellules infectées de migrer vers des sites anatomiques privilégiés, où leur reconnaissance par le système immunitaire est moindre? Afin de répondre à cette question, nous collaborons avec deux autres laboratoires du groupe CanCURE, afin d'utiliser le modèle de souris humanisées BLT (« bone marrow – liver – thymus ») (Lan et al., 2006). En effet, les souris BLT infectées par le VIH développent une immunité anti-VIH tant cellulaire qu'humorale (Brainard et al., 2009), voient leur charge virale supprimée après l'initiation de ART et possèdent un réservoir de lymphocytes T CD4+ infectés et latents capables d'être réactivés (Denton et al., 2012), ce qui en fait un excellent modèle animal pour l'étude des réservoirs du VIH. Ce modèle nous permettra d'abord d'évaluer la présence de cellules infectées exprimant fortement VLA-4 au niveau de différents organes, puisque nos données sont actuellement limitées aux cellules T CD4+ en circulation. De plus, nous évaluerons l'impact des différents antagonistes mentionnés plus haut sur la distribution anatomique des cellules infectées, ainsi que sur leur survie. Compte tenu des risques élevés de PML, il est fort improbable que le natalizumab devienne un traitement prescrit aux PVVIH, mais les résultats obtenus dans le modèle murin pourraient nous informer sur un nouveau mécanisme de maintien des réservoirs de VIH.

4.2.5. Comprendre l'enrichissement en défaut du Ψ dans les provirus inducibles

L'une des plus grandes interrogations soulevées par ce travail est de comprendre la raison pour laquelle les cellules p24+ sont considérablement enrichies en provirus présentant un défaut dans le locus Ψ . Dans certains cas, il s'agit d'une délétion complète du Ψ et même du codon

d'initiation de *gag*, ce qui a également été observé par Cole et coll. (Cole et al., 2021). Comment des provirus ne possédant pas le codon d'initiation de *gag* peuvent-ils produire la p24 détectée par notre méthode ? Nous avons repéré un codon d'initiation alternatif à plus de 400 nucléotides en aval du codon classiquement utilisé : cette délétion de *gag* fait en sorte que la matrice virale (p17, positions 790 à 1185) ne sera pas traduite, due à son absence dans le génome, et que les 16 à 115 premiers nucléotides de la capsid (p24) seront manquants. Puisque ces cellules sont identifiées via la détection de la capsid virale, il apparaît que cette délétion n'empêche pas la synthèse de la protéine, contrairement à ce qui a été suggéré auparavant (Cho et al., 2022).

Les mutations et délétions partielles ou totales du Ψ sont plus compliquées à comprendre. Premièrement, tous les défauts du Ψ retrouvés parmi les cellules p24+ couvrent la zone du MSD, dans la boucle SL2, région pivot de l'encapsidation, mais surtout dans l'épissage alternatif des ARNm du virus. Puisque *gag* est le premier ORF du génome du VIH, la traduction de cet ARNm ne nécessite pas d'épissage, ce qui explique la détection de cette protéine. En revanche, la perte du MSD devrait, en théorie, empêcher la synthèse des ARNm épissés nécessaire à la traduction des autres protéines virales, incluant Tat, qui est capital pour l'élongation de la transcription virale. Le HIV-Flow utilise, comme plusieurs autres protocoles d'activation des réservoirs *in vitro*, la PMA, qui permet la production de particules virales même en absence de Tat (Luznik et al., 1995). Dans cette optique, nous tentons d'établir si une méthode d'activation plus physiologique, comme la stimulation CD3-CD28 utilisée dans le qVOA de notre étude (Dufour, Richard, et al., 2023), permettrait d'augmenter la proportion de provirus intacts au sein des cellules p24+.

Malgré tout, l'enrichissement des défauts de Ψ parmi les provirus induits par PMA/iono demeure mystérieux. Une étude récente a démontré que les défauts du Ψ , plus particulièrement une délétion de 15-22 pb au niveau du SL2, sont détectés dans les provirus responsables de la virémie non suppressive chez certaines PVVIH sous ART depuis des années et en absence de mutation de résistance apparente aux antirétroviraux (White et al., 2023). La perte du MSD qui accompagne ces défauts de Ψ est connue pour engendrer la synthèse d'ARNm dont l'épissage alternatif est modifié, puisque cette délétion crée un nouveau site donneur d'épissage. Ces ARNm alternatifs conduisent à la synthèse de certaines protéines virales incluant Tat, mais causent une réduction de la production des protéines d'enveloppe (Pollack et al., 2017; White et al., 2023). Autre fait

surprenant, la dimérisation des deux brins d'ARN viraux et leur encapsidation n'est que partiellement affectée chez les provirus Ψ -défectifs (White et al., 2023). Ces provirus mutés dans Ψ seraient en théorie capable produire des virions non-infectieux, contenant peu de protéines d'enveloppe, et échappant à la réponse immunitaire (White et al., 2023), ce qui pourrait expliquer pourquoi les provirus présentant ces défauts sont maintenus dans le temps. Au-delà d'une reconnaissance moindre par les anticorps ciblant l'enveloppe, l'échappement immunitaire pourrait résulter du fait que la structure ARN du Ψ ainsi modifiée n'est pas reconnue par des senseurs d'ARN cytoplasmique tel que RIG-I (« retinoid-induced gene 1 ») (Huang et al., 2000), qui est connu pour entraîner l'apoptose de la cellule suite à la détection d'ARN viral comme celui du VIH (P. Li et al., 2016). Il serait d'ailleurs intéressant d'évaluer le niveau d'expression des facteurs pro-survies comme Bcl-2 sur les cellules infectées avec un provirus inductible dont le Ψ est défectueux.

Ya-Chi Ho démontrait en 2013 que les provirus présentant un défaut du Ψ , que ce soit une mutation ponctuelle du MSD ou une délétion de 8 pb dans le SL2, étaient capable de répliquer, mais de façon nettement inférieure (Ho et al., 2013). Ceci s'explique sûrement par le fait qu'il existe un MSD alternatif (Pollack et al., 2017), situé 4 nucléotides en aval du MSD canonique (Purcell & Martin, 1993). À ce stade, il est pertinent de se demander si nous ne catégorisons pas à tort ces provirus comme défectifs, particulièrement ceux dont seul le MSD est muté. Tout ceci souligne les carences dans la connaissance des mécanismes d'action et du rôle du Ψ dans la réplication virale. Afin de mieux définir l'impact de ces mutations sur la réplication du VIH, nous avons entamé le développement d'une méthode d'assemblage Gibson (Gibson et al., 2009) permettant la reconstruction de nos séquences Ψ -défectives dans un vecteur d'expression du virus NL4.3. Cloner une séquence quasi complète de VIH est une tâche ardue, compte tenu de la longueur de l'insert et du fait que les 2 LTRs sont identiques. Néanmoins, nos résultats préliminaires démontrent qu'une construction Gibson en trois fragments est possible. Ceci nous permettra d'identifier les transcrits viraux et les protéines virales synthétisés lorsque le MSD ou le SL2 du Ψ sont manquants, et de quantifier le potentiel réplcatif de ces provirus *in vitro*.

Épilogue

Aux yeux des chercheurs (biologistes, virologistes, immunologistes) de par le monde, l'infection au VIH est un casse-tête des plus complexes, et l'énigme que représente la guérison de cette infection n'a toujours pas été résolue après 40 ans de recherches. Heureusement pour les PVVIH, ces quatre décennies sont jalonnées de progrès importants qui ont non seulement augmenté leur espérance de vie, mais également leur qualité de vie : l'arrivée des ARVs, l'efficacité des thérapies combinées pour supprimer la charge virale, les prophylaxies pré- et post-exposition (PrEP et PEP), le développement de thérapies en un seul comprimé ne devant être pris qu'une fois par jour, la preuve que « indétectable = intransmissible », la possibilité pour une femme séropositive d'avoir des enfants, et finalement, les premiers cas de guérison.

Trouverons-nous un jour une guérison administrable à grande échelle ? La question demeure. De toute évidence, il nous manque encore plusieurs informations sur les mécanismes de latence et de maintien des cellules infectées, et sur l'impact de la persistance de ces cellules sur le reste de l'organisme. Néanmoins, chaque étude sur le VIH, aussi petite soit-elle, apporte son grain de sable aux connaissances requises pour espérer guérir les PVVIH. Cette thèse, bien humblement, aura su apporter sa contribution aux efforts dans la quête de traitements curatifs contre l'infection à VIH.

Avant 1996, recevoir un diagnostic de VIH équivalait à une condamnation. Heureusement, les ART combinés permettent désormais aux PVVIH d'avoir une espérance de vie similaire aux autres. Considérant cela, pourquoi encore chercher des traitements curatifs en 2023 ? Les raisons sont nombreuses : parce que les PVVIH qui prennent des ART depuis plus de 20 ans développent plus de comorbidités que les gens du même âge ; parce que l'inflammation chronique causée par l'infection entraîne un vieillissement prématuré du système immunitaire ; parce que toutes les PVVIH n'ont pas une virémie totalement contrôlée par les ART ; parce que la prise quotidienne et à vie de ART représente un coût faramineux, encore plus dans les endroits dans le monde où ces médicaments ne sont pas couverts par une assurance ; parce que les PVVIH vivent encore et toujours avec un stigma, une honte et le stress de transmettre le virus aux gens qu'ils aiment ; et

parce que ce ne sont pas toutes les PVVIH qui ont accès à des soins de santé réguliers ni aux ART. Pour ces personnes, la guérison reste une priorité. Je terminerai donc cette thèse avec toute l'empathie que j'éprouve pour ces PVVIH, et celles qui s'impliquent dans la recherche : sans vous, votre temps, vos dons et votre contribution, nous ne saurions rien de l'infection au VIH.



Figure 25. – Retrouvailles du laboratoire Chomont dans le cadre de AIDS 2022

Références bibliographiques

- (CDC), C. f. D. C. (1981a). Kaposi's sarcoma and Pneumocystis pneumonia among homosexual men--New York City and California. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, 30(25), 305-308.
- (CDC), C. f. D. C. (1981b). Pneumocystis pneumonia--Los Angeles. 1981. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, 45(34), 729-733. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8778581>
- (CDC), C. f. D. C. a. P. (2023, 2021-05-20). *AIDS and Opportunistic Infections*. Retrieved 2023-11-02 from <https://www.cdc.gov/hiv/basics/livingwithhiv/opportunisticinfections.html>
- Abrahams, M. R., Joseph, S. B., Garrett, N., Tyers, L., Moeser, M., Archin, N., Council, O. D., Matten, D., Zhou, S., Doolabh, D., Anthony, C., Goonetilleke, N., Karim, S. A., Margolis, D. M., Pond, S. K., Williamson, C., & Swanstrom, R. (2019). The replication-competent HIV-1 latent reservoir is primarily established near the time of therapy initiation. *Sci Transl Med*, 11(513). <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aaw5589>
- Ait-Ammar, A., Kula, A., Darcis, G., Verdikt, R., De Wit, S., Gautier, V., Mallon, P. W. G., Marcello, A., Rohr, O., & Van Lint, C. (2019). Current Status of Latency Reversing Agents Facing the Heterogeneity of HIV-1 Cellular and Tissue Reservoirs. *Front Microbiol*, 10, 3060. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.03060>
- Alkhatib, G., & Berger, E. A. (2007). HIV coreceptors: from discovery and designation to new paradigms and promise. *Eur J Med Res*, 12(9), 375-384. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17933717>
- Alkhatib, G., Combadiere, C., Broder, C. C., Feng, Y., Kennedy, P. E., Murphy, P. M., & Berger, E. A. (1996). CC CKR5: A RANTES, MIP-1 α , MIP-1 β Receptor as a Fusion Cofactor for Macrophage-Tropic HIV-1. *Science*, 272(5270), 1955-1958. <https://doi.org/doi:10.1126/science.272.5270.1955>
- Almeida, C. A., Price, P., & French, M. A. (2002). Immune activation in patients infected with HIV type 1 and maintaining suppression of viral replication by highly active antiretroviral therapy. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 18(18), 1351-1355. <https://doi.org/10.1089/088922202320935429>
- Ananworanich, J., Chomont, N., Eller, L. A., Kroon, E., Tovanabutra, S., Bose, M., Nau, M., Fletcher, J. L. K., Tipsuk, S., Vandergeeten, C., O'Connell, R. J., Pinyakorn, S., Michael, N., Phanuphak, N., Robb, M. L., Rv, & groups, R. S. s. (2016). HIV DNA Set Point is Rapidly Established in

- Acute HIV Infection and Dramatically Reduced by Early ART. *EBioMedicine*, 11, 68-72.
<https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2016.07.024>
- Ananworanich, J., Puthanakit, T., Suntarattiwong, P., Chokephaibulkit, K., Kerr, S. J., Fromentin, R., Bakeman, W., Intasan, J., Mahanontharit, A., Sirivichayakul, S., Chomont, N., & Group, H.-N. S. (2014). Reduced markers of HIV persistence and restricted HIV-specific immune responses after early antiretroviral therapy in children. *AIDS*, 28(7), 1015-1020.
<https://doi.org/10.1097/QAD.000000000000178>
- Archin, N. M., Keedy, K. S., Espeseth, A., Dang, H., Hazuda, D. J., & Margolis, D. M. (2009). Expression of latent human immunodeficiency type 1 is induced by novel and selective histone deacetylase inhibitors. *AIDS*, 23(14), 1799-1806.
<https://doi.org/10.1097/QAD.0b013e32832ec1dc>
- 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., Eron, J., Gay, C. L., Goonetilleke, N., & Margolis, D. M. (2017). Interval dosing with the HDAC inhibitor vorinostat effectively reverses HIV latency. *J Clin Invest*, 127(8), 3126-3135. <https://doi.org/10.1172/JCI92684>
- 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., Richman, D. D., Hudgens, M. G., Bosch, R. J., Coffin, J. M., Eron, J. J., Hazuda, D. J., & Margolis, D. M. (2012). Administration of vorinostat disrupts HIV-1 latency in patients on antiretroviral therapy. *Nature*, 487(7408), 482-485. <https://doi.org/10.1038/nature11286>
- Assoumou, L., Weiss, L., Piketty, C., Burgard, M., Melard, A., Girard, P. M., Rouzioux, C., Costagliola, D., & group, A. S. s. (2015). A low HIV-DNA level in peripheral blood mononuclear cells at antiretroviral treatment interruption predicts a higher probability of maintaining viral control. *AIDS*, 29(15), 2003-2007.
<https://doi.org/10.1097/QAD.0000000000000734>
- Astorga-Gamaza, A., Grau-Exposito, J., Burgos, J., Navarro, J., Curran, A., Planas, B., Suanzes, P., Falco, V., Genesca, M., & Buzon, M. J. (2022). Identification of HIV-reservoir cells with reduced susceptibility to antibody-dependent immune response. *Elife*, 11.
<https://doi.org/10.7554/eLife.78294>
- Avalos, C. R., Abreu, C. M., Queen, S. E., Li, M., Price, S., Shirk, E. N., Engle, E. L., Forsyth, E., Bullock, B. T., Mac Gabhann, F., Wietgreffe, S. W., Haase, A. T., Zink, M. C., Mankowski, J. L., Clements, J. E., & Gama, L. (2017). Brain Macrophages in Simian Immunodeficiency Virus-Infected, Antiretroviral-Suppressed Macaques: a Functional Latent Reservoir. *mBio*, 8(4).
<https://doi.org/10.1128/mBio.01186-17>

- Avettand-Fenoel, V., Hocqueloux, L., Ghosn, J., Cheret, A., Frange, P., Melard, A., Viard, J. P., & Rouzioux, C. (2016). Total HIV-1 DNA, a Marker of Viral Reservoir Dynamics with Clinical Implications. *Clin Microbiol Rev*, 29(4), 859-880. <https://doi.org/10.1128/CMR.00015-16>
- Bailey, J. R., Sedaghat, A. R., Kieffer, T., Brennan, T., Lee, P. K., Wind-Rotolo, M., Haggerty, C. M., Kamireddi, A. R., Liu, Y., Lee, J., Persaud, D., Gallant, J. E., Cofrancesco, J., Jr., Quinn, T. C., Wilke, C. O., Ray, S. C., Siliciano, J. D., Nettles, R. E., & Siliciano, R. F. (2006). 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*, 80(13), 6441-6457. <https://doi.org/10.1128/JVI.00591-06>
- Banga, R., Procopio, F. A., Noto, A., Pollakis, G., Cavassini, M., Ohmiti, K., Corpataux, J. M., de Leval, L., Pantaleo, G., & Perreau, M. (2016). PD-1(+) and follicular helper T cells are responsible for persistent HIV-1 transcription in treated aviremic individuals. *Nat Med*, 22(7), 754-761. <https://doi.org/10.1038/nm.4113>
- Banga, R., Procopio, F. A., Ruggiero, A., Noto, A., Ohmiti, K., Cavassini, M., Corpataux, J. M., Paxton, W. A., Pollakis, G., & Perreau, M. (2018). Blood CXCR3(+) CD4 T Cells Are Enriched in Inducible Replication Competent HIV in Aviremic Antiretroviral Therapy-Treated Individuals. *Front Immunol*, 9, 144. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00144>
- Barboric, M., Nissen, R. M., Kanazawa, S., Jabrane-Ferrat, N., & Peterlin, B. M. (2001). NF-kappaB binds P-TEFb to stimulate transcriptional elongation by RNA polymerase II. *Mol Cell*, 8(2), 327-337. [https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(01\)00314-8](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(01)00314-8)
- Barre-Sinoussi, F., Chermann, J. C., Rey, F., Nugeyre, M. T., Chamaret, S., Gruest, J., Dauguet, C., Axler-Blin, C., Vezinet-Brun, F., Rouzioux, C., Rozenbaum, W., & Montagnier, L. (1983). Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science*, 220(4599), 868-871. <https://doi.org/10.1126/science.6189183>
- Bartholomeeusen, K., Xiang, Y., Fujinaga, K., & 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(43), 36609-36616. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.410746>
- Bartlett, J. A., Benoit, S. L., Johnson, V. A., Quinn, J. B., Sepulveda, G. E., Ehmann, W. C., Tsoukas, C., Fallon, M. A., Self, P. L., & Rubin, M. (1996). Lamivudine plus zidovudine compared with zalcitabine plus zidovudine in patients with HIV infection. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. North American HIV Working Party. *Ann Intern Med*, 125(3), 161-172. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-125-3-199608010-00001>

- Baudin, F., Marquet, R., Isel, C., Darlix, J.-L., Ehresmann, B., & Ehresmann, C. (1993). Functional Sites in the 5' Region of Human Immunodeficiency Virus Type 1 RNA Form Defined Structural Domains. *Journal of Molecular Biology*, 229(2), 382-397. <https://doi.org/https://doi.org/10.1006/jmbi.1993.1041>
- Baumer, C., Fisch, E., Wedler, H., Reinecke, F., & Korfhage, C. (2018). Exploring DNA quality of single cells for genome analysis with simultaneous whole-genome amplification. *Sci Rep*, 8(1), 7476. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-25895-7>
- Baxter, A. E., Niessl, J., Fromentin, R., Richard, J., Porichis, F., Charlebois, R., Massanella, M., Brassard, N., Alshafiq, N., Delgado, G. G., Routy, J. P., Walker, B. D., Finzi, A., Chomont, N., & Kaufmann, D. E. (2016). Single-Cell Characterization of Viral Translation-Competent Reservoirs in HIV-Infected Individuals. *Cell Host Microbe*, 20(3), 368-380. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2016.07.015>
- Baxter, A. E., Niessl, J., Fromentin, R., Richard, J., Porichis, F., Massanella, M., Brassard, N., Alshafiq, N., Routy, J. P., Finzi, A., Chomont, N., & Kaufmann, D. E. (2017). Multiparametric characterization of rare HIV-infected cells using an RNA-flow FISH technique. *Nat Protoc*, 12(10), 2029-2049. <https://doi.org/10.1038/nprot.2017.079>
- BD. (2016). *BD Launches BD FACSymphony™ High-Speed Cell Analyzer to Enable Identification and Analysis of Rare Cell Types*. BD. Retrieved 2023-01-05 from <https://www.bd.com/en-ca/company/news-and-media/press-releases/feb-8-2016-bd-launches-bd-facsymphony-high-speed-cell-analyzer-to-enable-identification-and-analysis-of-rare-cell-types>
- Beckford-Vera, D. R., Flavell, R. R., Seo, Y., Martinez-Ortiz, E., Aslam, M., Thanh, C., Fehrman, E., Pardons, M., Kumar, S., Deitchman, A. N., Ravanfar, V., Schulte, B., Wu, I. K., Pan, T., Reeves, J. D., Nixon, C. C., Iyer, N. S., Torres, L., Munter, S. E., . . . Henrich, T. J. (2022). First-in-human immunoPET imaging of HIV-1 infection using (89)Zr-labeled VRC01 broadly neutralizing antibody. *Nat Commun*, 13(1), 1219. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-28727-5>
- Beerens, N., Klaver, B., & Berkhout, B. (2000). A structured RNA motif is involved in correct placement of the tRNA(3)(Lys) primer onto the human immunodeficiency virus genome. *J Virol*, 74(5), 2227-2238. <https://doi.org/10.1128/jvi.74.5.2227-2238.2000>
- Beliakova-Bethell, N., Manousopoulou, A., Deshmukh, S., Mukim, A., Richman, D. D., Garbis, S. D., & Spina, C. A. (2022). Integrated proteomics and transcriptomics analyses identify novel cell surface markers of HIV latency. *Virology*, 573, 50-58. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2022.06.003>

- Besson, G. J., Lalama, C. M., Bosch, R. J., Gandhi, R. T., Bedison, M. A., Aga, E., Riddler, S. A., McMahon, D. K., Hong, F., & Mellors, J. W. (2014). HIV-1 DNA decay dynamics in blood during more than a decade of suppressive antiretroviral therapy. *Clin Infect Dis*, 59(9), 1312-1321. <https://doi.org/10.1093/cid/ciu585>
- Betts, M. R., Nason, M. C., West, S. M., De Rosa, S. C., Migueles, S. A., Abraham, J., Lederman, M. M., Benito, J. M., Goepfert, P. A., Connors, M., Roederer, M., & Koup, R. A. (2006). HIV nonprogressors preferentially maintain highly functional HIV-specific CD8+ T cells. *Blood*, 107(12), 4781-4789. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-12-4818>
- Binda, C. S., Klaver, B., Berkhout, B., & Das, A. T. (2020). CRISPR-Cas9 Dual-gRNA Attack Causes Mutation, Excision and Inversion of the HIV-1 Proviral DNA. *Viruses*, 12(3). <https://doi.org/10.3390/v12030330>
- Blackard, J. T., Ma, G., Martin, C. M., Rouster, S. D., Shata, M. T., & Sherman, K. E. (2011). HIV variability in the liver and evidence of possible compartmentalization. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 27(10), 1117-1126. <https://doi.org/10.1089/AID.2010.0329>
- Blankson, J. N., Finzi, D., Pierson, T. C., Sabundayo, B. P., Chadwick, K., Margolick, J. B., Quinn, T. C., & Siliciano, R. F. (2000). Biphasic decay of latently infected CD4+ T cells in acute human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Infect Dis*, 182(6), 1636-1642. <https://doi.org/10.1086/317615>
- Blankson, J. N., Persaud, D., & Siliciano, R. F. (2002). The challenge of viral reservoirs in HIV-1 infection. *Annu Rev Med*, 53, 557-593. <https://doi.org/10.1146/annurev.med.53.082901.104024>
- Boritz, E. A., Darko, S., Swaszek, L., Wolf, G., Wells, D., Wu, X., Henry, A. R., Laboune, F., Hu, J., Ambrozak, D., Hughes, M. S., Hoh, R., Casazza, J. P., Vostal, A., Bunis, D., Nganou-Makamdop, K., Lee, J. S., Migueles, S. A., Koup, R. A., . . . Douek, D. C. (2016). Multiple Origins of Virus Persistence during Natural Control of HIV Infection. *Cell*, 166(4), 1004-1015. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.06.039>
- Bosque, A., Famiglietti, M., Weyrich, A. S., Goulston, C., & Planelles, V. (2011). Homeostatic proliferation fails to efficiently reactivate HIV-1 latently infected central memory CD4+ T cells. *PLoS Pathog*, 7(10), e1002288. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002288>
- Brainard, D. M., Seung, E., Frahm, N., Cariappa, A., Bailey, C. C., Hart, W. K., Shin, H. S., Brooks, S. F., Knight, H. L., Eichbaum, Q., Yang, Y. G., Sykes, M., Walker, B. D., Freeman, G. J., Pillai, S., Westmoreland, S. V., Brander, C., Luster, A. D., & Tager, A. M. (2009). Induction of robust cellular and humoral virus-specific adaptive immune responses in human

- immunodeficiency virus-infected humanized BLT mice. *J Virol*, 83(14), 7305-7321. <https://doi.org/10.1128/JVI.02207-08>
- Breitfeld, D., Ohl, L., Kremmer, E., Ellwart, J., Sallusto, F., Lipp, M., & Förster, R. (2000). Follicular B helper T cells express CXC chemokine receptor 5, localize to B cell follicles, and support immunoglobulin production. *J Exp Med*, 192(11), 1545-1552. <https://doi.org/10.1084/jem.192.11.1545>
- Brenchley, J. M., Hill, B. J., Ambrozak, D. R., Price, D. A., Guenaga, F. J., Casazza, J. P., Kuruppu, J., Yazdani, J., Migueles, S. A., Connors, M., Roederer, M., Douek, D. C., & Koup, R. A. (2004). T-cell subsets that harbor human immunodeficiency virus (HIV) in vivo: implications for HIV pathogenesis. *J Virol*, 78(3), 1160-1168. <https://doi.org/10.1128/jvi.78.3.1160-1168.2004>
- Brese, R. L., Gonzalez-Perez, M. P., Koch, M., O'Connell, O., Luzuriaga, K., Somasundaran, M., Clapham, P. R., Dollar, J. J., Nolan, D. J., Rose, R., & Lamers, S. L. (2018). Ultradeep single-molecule real-time sequencing of HIV envelope reveals complete compartmentalization of highly macrophage-tropic R5 proviral variants in brain and CXCR4-using variants in immune and peripheral tissues. *J Neurovirol*, 24(4), 439-453. <https://doi.org/10.1007/s13365-018-0633-5>
- Bretschneider, I., Clemente, M. J., Meisel, C., Guerreiro, M., Streitz, M., Hopfenmuller, W., Maciejewski, J. P., Wlodarski, M. W., & Volk, H. D. (2014). Discrimination of T-cell subsets and T-cell receptor repertoire distribution. *Immunol Res*, 58(1), 20-27. <https://doi.org/10.1007/s12026-013-8473-0>
- Broder, C. C., & Berger, E. A. (1995). Fusogenic selectivity of the envelope glycoprotein is a major determinant of human immunodeficiency virus type 1 tropism for CD4+ T-cell lines vs. primary macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92(19), 9004-9008. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.19.9004>
- Bruner, K. M., Hosmane, N. N., & Siliciano, R. F. (2015). Towards an HIV-1 cure: measuring the latent reservoir. *Trends in Microbiology*, 23(4), 192-203. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.tim.2015.01.013>
- Bruner, K. M., Murray, A. J., Pollack, R. A., Soliman, M. G., Laskey, S. B., Capoferri, A. A., Lai, J., Strain, M. C., Lada, S. M., Hoh, R., Ho, Y. C., Richman, D. D., Deeks, S. G., Siliciano, J. D., & Siliciano, R. F. (2016). Defective proviruses rapidly accumulate during acute HIV-1 infection. *Nat Med*, 22(9), 1043-1049. <https://doi.org/10.1038/nm.4156>
- Bruner, K. M., Wang, Z., Simonetti, F. R., Bender, A. M., Kwon, K. J., Sengupta, S., Fray, E. J., Beg, S. A., Antar, A. A. R., Jenike, K. M., Bertagnolli, L. N., Capoferri, A. A., Kufera, J. T., Timmons,

- A., Nobles, C., Gregg, J., Wada, N., Ho, Y. C., Zhang, H., . . . Siliciano, R. F. (2019). A quantitative approach for measuring the reservoir of latent HIV-1 proviruses. *Nature*, 566(7742), 120-125. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-0898-8>
- Brussel, A., & Sonigo, P. (2003). Analysis of early human immunodeficiency virus type 1 DNA synthesis by use of a new sensitive assay for quantifying integrated provirus. *J Virol*, 77(18), 10119-10124. <https://doi.org/10.1128/jvi.77.18.10119-10124.2003>
- Buck, C. B., Shen, X., Egan, M. A., Pierson, T. C., Walker, C. M., & Siliciano, R. F. (2001). The human immunodeficiency virus type 1 gag gene encodes an internal ribosome entry site. *J Virol*, 75(1), 181-191. <https://doi.org/10.1128/JVI.75.1.181-191.2001>
- Buenrostro, J. D., Giresi, P. G., Zaba, L. C., Chang, H. Y., & Greenleaf, W. J. (2013). Transposition of native chromatin for fast and sensitive epigenomic profiling of open chromatin, DNA-binding proteins and nucleosome position. *Nat Methods*, 10(12), 1213-1218. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2688>
- Bui, J. K., Sobolewski, M. D., Keele, B. F., Spindler, J., Musick, A., Wiegand, A., Luke, B. T., Shao, W., Hughes, S. H., Coffin, J. M., Kearney, M. F., & Mellors, J. W. (2017). Proviruses with identical sequences comprise a large fraction of the replication-competent HIV reservoir. *PLoS Pathog*, 13(3), e1006283. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006283>
- Burdick, R. C., Li, C., Munshi, M., Rawson, J. M. O., Nagashima, K., Hu, W. S., & Pathak, V. K. (2020). HIV-1 uncoats in the nucleus near sites of integration. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 117(10), 5486-5493. <https://doi.org/10.1073/pnas.1920631117>
- Buzon, M. J., Martin-Gayo, E., Pereyra, F., Ouyang, Z., Sun, H., Li, J. Z., Piovoso, M., Shaw, A., Dalmau, J., Zangger, N., Martinez-Picado, J., Zurakowski, R., Yu, X. G., Telenti, A., Walker, B. D., Rosenberg, E. S., & Lichtenfeld, M. (2014). Long-term antiretroviral treatment initiated at primary HIV-1 infection affects the size, composition, and decay kinetics of the reservoir of HIV-1-infected CD4 T cells. *J Virol*, 88(17), 10056-10065. <https://doi.org/10.1128/JVI.01046-14>
- Buzon, M. J., Sun, H., Li, C., Shaw, A., Seiss, K., Ouyang, Z., Martin-Gayo, E., Leng, J., Henrich, T. J., Li, J. Z., Pereyra, F., Zurakowski, R., Walker, B. D., Rosenberg, E. S., Yu, X. G., & Lichtenfeld, M. (2014). HIV-1 persistence in CD4+ T cells with stem cell-like properties. *Nat Med*, 20(2), 139-142. <https://doi.org/10.1038/nm.3445>
- Canada, G. d. (2022, 2022-01-26). *VIH et sida : Pour les professionnels de la santé*. Gouvernement du Canada. Retrieved 2023-02-16 from <https://www.canada.ca/fr/sante-publique/services/maladies/vih-et-sida/professionnels-sante.html>

- Cantero-Perez, J., Grau-Exposito, J., Serra-Peinado, C., Rosero, D. A., Luque-Ballesteros, L., Astorga-Gamaza, A., Castellvi, J., Sanhueza, T., Tapia, G., Lloveras, B., Fernandez, M. A., Prado, J. G., Sole-Sedeno, J. M., Tarrats, A., Lecumberri, C., Manalich-Barrachina, L., Centeno-Mediavilla, C., Falco, V., Buzon, M. J., & Genesca, M. (2019). Resident memory T cells are a cellular reservoir for HIV in the cervical mucosa. *Nat Commun*, *10*(1), 4739. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-12732-2>
- Chaillon, A., Gianella, S., Dellicour, S., Rawlings, S. A., Schlub, T. E., De Oliveira, M. F., Ignacio, C., Porrachia, M., Vrancken, B., & Smith, D. M. (2020). HIV persists throughout deep tissues with repopulation from multiple anatomical sources. *J Clin Invest*, *130*(4), 1699-1712. <https://doi.org/10.1172/JCI134815>
- Chang, S. T., Sova, P., Peng, X., Weiss, J., Law, G. L., Palermo, R. E., & Katze, M. G. (2011). Next-generation sequencing reveals HIV-1-mediated suppression of T cell activation and RNA processing and regulation of noncoding RNA expression in a CD4+ T cell line. *mBio*, *2*(5). <https://doi.org/10.1128/mBio.00134-11>
- Chardin, P., & McCormick, F. (1999). Brefeldin A: The Advantage of Being Uncompetitive. *Cell*, *97*(2), 153-155. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80724-2](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80724-2)
- Chen, G., Ning, B., & Shi, T. (2019). Single-Cell RNA-Seq Technologies and Related Computational Data Analysis. *Front Genet*, *10*, 317. <https://doi.org/10.3389/fgene.2019.00317>
- Chew, G. M., Fujita, T., Webb, G. M., Burwitz, B. J., Wu, H. L., Reed, J. S., Hammond, K. B., Clayton, K. L., Ishii, N., Abdel-Mohsen, M., Liegler, T., Mitchell, B. I., Hecht, F. M., Ostrowski, M., Shikuma, C. M., Hansen, S. G., Maurer, M., Korman, A. J., Deeks, S. G., . . . Ndhlovu, L. C. (2016). TIGIT Marks Exhausted T Cells, Correlates with Disease Progression, and Serves as a Target for Immune Restoration in HIV and SIV Infection. *PLoS Pathog*, *12*(1), e1005349. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005349>
- Cho, A., Gaebler, C., Oliveira, T., Ramos, V., Saad, M., Lorenzi, J. C. C., Gazumyan, A., Moir, S., Caskey, M., Chun, T. W., & Nussenzweig, M. C. (2022). Longitudinal clonal dynamics of HIV-1 latent reservoirs measured by combination quadruplex polymerase chain reaction and sequencing. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *119*(4). <https://doi.org/10.1073/pnas.2117630119>
- Chomont, N., El-Far, M., Ancuta, P., Trautmann, L., Procopio, F. A., Yassine-Diab, B., Boucher, G., Boulassel, M. R., Ghattas, G., Brenchley, J. M., Schacker, T. W., Hill, B. J., Douek, D. C., Routy, J. P., Haddad, E. K., & Sekaly, R. P. (2009). HIV reservoir size and persistence are driven by T cell survival and homeostatic proliferation. *Nat Med*, *15*(8), 893-900. <https://doi.org/10.1038/nm.1972>

- Chougui, G., Munir-Matloob, S., Matkovic, R., Martin, M. M., Morel, M., Lahouassa, H., Leduc, M., Ramirez, B. C., Etienne, L., & Margottin-Goguet, F. (2018). HIV-2/SIV viral protein X counteracts HUSH repressor complex. *Nat Microbiol*, 3(8), 891-897. <https://doi.org/10.1038/s41564-018-0179-6>
- Christopherson, C., Kidane, Y., Conway, B., Krowka, J., Sheppard, H., & Kwok, S. (2000). PCR-Based assay to quantify human immunodeficiency virus type 1 DNA in peripheral blood mononuclear cells. *J Clin Microbiol*, 38(2), 630-634. <https://doi.org/10.1128/jcm.38.2.630-634.2000>
- Chun, T. W., Carruth, L., Finzi, D., Shen, X., DiGiuseppe, J. A., Taylor, H., Hermankova, M., Chadwick, K., Margolick, J., Quinn, T. C., Kuo, Y. H., Brookmeyer, R., Zeiger, M. A., Barditch-Crovo, P., & Siliciano, R. F. (1997). Quantification of latent tissue reservoirs and total body viral load in HIV-1 infection. *Nature*, 387(6629), 183-188. <https://doi.org/10.1038/387183a0>
- Chun, T. W., Finzi, D., Margolick, J., Chadwick, K., Schwartz, D., & Siliciano, R. F. (1995). In vivo fate of HIV-1-infected T cells: quantitative analysis of the transition to stable latency. *Nat Med*, 1(12), 1284-1290. <https://doi.org/10.1038/nm1295-1284>
- Chun, T. W., Nickle, D. C., Justement, J. S., Meyers, J. H., Roby, G., Hallahan, C. W., Kottlil, S., Moir, S., Mican, J. M., Mullins, J. I., Ward, D. J., Kovacs, J. A., Mannon, P. J., & Fauci, A. S. (2008). Persistence of HIV in gut-associated lymphoid tissue despite long-term antiretroviral therapy. *J Infect Dis*, 197(5), 714-720. <https://doi.org/10.1086/527324>
- Chun, T. W., Stuyver, L., Mizell, S. B., Ehler, L. A., Mican, J. A., Baseler, M., Lloyd, A. L., Nowak, M. A., & 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(24), 13193-13197. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.24.13193>
- Churchill, M. J., Gorry, P. R., Cowley, D., Lal, L., Sonza, S., Purcell, D. F., Thompson, K. A., Gabuzda, D., McArthur, J. C., Pardo, C. A., & Wesselingh, S. L. (2006). Use of laser capture microdissection to detect integrated HIV-1 DNA in macrophages and astrocytes from autopsy brain tissues. *J Neurovirol*, 12(2), 146-152. <https://doi.org/10.1080/13550280600748946>
- Cicilionyte, A., Berkhout, B., & Pasternak, A. O. (2021). Assessing proviral competence: current approaches to evaluate HIV-1 persistence. *Curr Opin HIV AIDS*, 16(4), 223-231. <https://doi.org/10.1097/COH.0000000000000687>
- Clark, I. C., Mudvari, P., Thaploo, S., Smith, S., Abu-Laban, M., Hamouda, M., Theberge, M., Shah, S., Ko, S. H., Perez, L., Bunis, D. G., Lee, J. S., Kilam, D., Zakaria, S., Choi, S., Darko, S., Henry,

- A. R., Wheeler, M. A., Hoh, R., . . . Boritz, E. A. (2023). HIV silencing and cell survival signatures in infected T cell reservoirs. *Nature*, 614(7947), 318-325. <https://doi.org/10.1038/s41586-022-05556-6>
- Clarke, J. R., Gates, A. J., Coker, R. J., Douglass, J. A., Williamson, J. D., & Mitchell, D. M. (1994). HIV-1 proviral DNA copy number in peripheral blood leucocytes and bronchoalveolar lavage cells of AIDS patients. *Clin Exp Immunol*, 96(2), 182-186. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.1994.tb06539.x>
- Clavel, F., Hoggan, M. D., Willey, R. L., Strebel, K., Martin, M. A., & Repaske, R. (1989). Genetic recombination of human immunodeficiency virus. *J Virol*, 63(3), 1455-1459. <https://doi.org/10.1128/JVI.63.3.1455-1459.1989>
- Clever, J., Sasseti, C., & Parslow, T. G. (1995). RNA secondary structure and binding sites for gag gene products in the 5' packaging signal of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol*, 69(4), 2101-2109. <https://doi.org/10.1128/jvi.69.4.2101-2109.1995>
- Clever, J. L., & Parslow, T. G. (1997). Mutant human immunodeficiency virus type 1 genomes with defects in RNA dimerization or encapsidation. *J Virol*, 71(5), 3407-3414. <https://doi.org/10.1128/jvi.71.5.3407-3414.1997>
- Clifford, D. B., De Luca, A., Simpson, D. M., Arendt, G., Giovannoni, G., & Nath, A. (2010). Natalizumab-associated progressive multifocal leukoencephalopathy in patients with multiple sclerosis: lessons from 28 cases. *Lancet Neurol*, 9(4), 438-446. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(10\)70028-4](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(10)70028-4)
- Climent, N., Ambrosioni, J., González, T., M., C., Noguera, M., Paredes, R., Plana, M., Mallolas, J., Alcamí, J., Sánchez-Palomino, S., & Miró, J. M. (2022, 29 July - 2 August 2022). *Exceptional post-treatment control associated with strong NK and CD8+ cytotoxic T cells* [Oral abstract session]. AIDS, Montreal (Canada). <https://programme.aids2022.org/Abstract/Abstract/?abstractid=5149>
- Cockerham, L. R., Siliciano, J. D., Sinclair, E., O'Doherty, U., Palmer, S., Yukl, S. A., Strain, M. C., Chomont, N., Hecht, F. M., Siliciano, R. F., Richman, D. D., & Deeks, S. G. (2014). CD4+ and CD8+ T cell activation are associated with HIV DNA in resting CD4+ T cells. *PLoS One*, 9(10), e110731. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0110731>
- Coffin, J. M., Wells, D. W., Zerbato, J. M., Kuruc, J. D., Guo, S., Luke, B. T., Eron, J. J., Bale, M., Spindler, J., Simonetti, F. R., Hill, S., Kearney, M. F., Maldarelli, F., Wu, X., Mellors, J. W., & Hughes, S. H. (2019). Clones of infected cells arise early in HIV-infected individuals. *JCI Insight*, 4(12). <https://doi.org/10.1172/jci.insight.128432>

- Cohen, Y. Z., Lorenzi, J. C. C., Krassnig, L., Barton, J. P., Burke, L., Pai, J., Lu, C. L., Mendoza, P., Oliveira, T. Y., Sleckman, C., Millard, K., Butler, A. L., Dizon, J. P., Belblidia, S. A., Witmer-Pack, M., Shimeliovich, I., Gulick, R. M., Seaman, M. S., Jankovic, M., . . . Nussenzweig, M. C. (2018). Relationship between latent and rebound viruses in a clinical trial of anti-HIV-1 antibody 3BNC117. *J Exp Med*, *215*(9), 2311-2324. <https://doi.org/10.1084/jem.20180936>
- Cohn, L. B., da Silva, I. T., Valieris, R., Huang, A. S., Lorenzi, J. C. C., Cohen, Y. Z., Pai, J. A., Butler, A. L., Caskey, M., Jankovic, M., & Nussenzweig, M. C. (2018). Clonal CD4(+) T cells in the HIV-1 latent reservoir display a distinct gene profile upon reactivation. *Nat Med*, *24*(5), 604-609. <https://doi.org/10.1038/s41591-018-0017-7>
- Cohn, L. B., Silva, I. T., Oliveira, T. Y., Rosales, R. A., Parrish, E. H., Learn, G. H., Hahn, B. H., Czartoski, J. L., McElrath, M. J., Lehmann, C., Klein, F., Caskey, M., Walker, B. D., Siliciano, J. D., Siliciano, R. F., Jankovic, M., & Nussenzweig, M. C. (2015). HIV-1 integration landscape during latent and active infection. *Cell*, *160*(3), 420-432. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.01.020>
- Colanzi, A., Grimaldi, G., Catara, G., Valente, C., Cericola, C., Liberali, P., Ronci, M., Lalioti, V. S., Bruno, A., Beccari, A. R., Urbani, A., De Flora, A., Nardini, M., Bolognesi, M., Luini, A., & Corda, D. (2013). Molecular mechanism and functional role of brefeldin A-mediated ADP-ribosylation of CtBP1/BARS. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *110*(24), 9794-9799. <https://doi.org/10.1073/pnas.1222413110>
- Cole, B., Lambrechts, L., Boyer, Z., Noppe, Y., De Scheerder, M. A., Eden, J. S., Vrancken, B., Schlub, T. E., McLaughlin, S., Frenkel, L. M., Palmer, S., & Vandekerckhove, L. (2022). Extensive characterization of HIV-1 reservoirs reveals links to plasma viremia before and during analytical treatment interruption. *Cell Rep*, *39*(4), 110739. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2022.110739>
- Cole, B., Lambrechts, L., Gantner, P., Noppe, Y., Bonine, N., Witkowski, W., Chen, L., Palmer, S., Mullins, J. I., Chomont, N., Pardons, M., & Vandekerckhove, L. (2021). In-depth single-cell analysis of translation-competent HIV-1 reservoirs identifies cellular sources of plasma viremia. *Nat Commun*, *12*(1), 3727. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-24080-1>
- Collins, K. L., Chen, B. K., Kalams, S. A., Walker, B. D., & Baltimore, D. (1998). HIV-1 Nef protein protects infected primary cells against killing by cytotoxic T lymphocytes. *Nature*, *391*(6665), 397-401. <https://doi.org/10.1038/34929>
- Collora, J. A., Liu, R., Pinto-Santini, D., Ravindra, N., Ganoza, C., Lama, J. R., Alfaro, R., Chiarella, J., Spudich, S., Mounzer, K., Tebas, P., Montaner, L. J., van Dijk, D., Duerr, A., & Ho, Y. C. (2022). Single-cell multiomics reveals persistence of HIV-1 in expanded cytotoxic T cell

clones. *Immunity*, 55(6), 1013-1031 e1017.
<https://doi.org/10.1016/j.immuni.2022.03.004>

Corey, L., Gilbert, P. B., Juraska, M., Montefiori, D. C., Morris, L., Karuna, S. T., Edupuganti, S., Mgodhi, N. M., deCamp, A. C., Rudnicki, E., Huang, Y., Gonzales, P., Cabello, R., Orrell, C., Lama, J. R., Laher, F., Lazarus, E. M., Sanchez, J., Frank, I., . . . Teams, H. H. S. (2021). Two Randomized Trials of Neutralizing Antibodies to Prevent HIV-1 Acquisition. *N Engl J Med*, 384(11), 1003-1014. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2031738>

Cosenza, M. A., Zhao, M. L., Si, Q., & Lee, S. C. (2002). Human brain parenchymal microglia express CD14 and CD45 and are productively infected by HIV-1 in HIV-1 encephalitis. *Brain Pathol*, 12(4), 442-455. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3639.2002.tb00461.x>

Costiniuk, C. T., Salahuddin, S., Farnos, O., Olivenstein, R., Pagliuzza, A., Orlova, M., Schurr, E., De Castro, C., Bourbeau, J., Routy, J. P., Ancuta, P., Chomont, N., & Jenabian, M. A. (2018). HIV persistence in mucosal CD4+ T cells within the lungs of adults receiving long-term suppressive antiretroviral therapy. *AIDS*, 32(16), 2279-2289. <https://doi.org/10.1097/QAD.0000000000001962>

Coull, J. J., Romerio, F., Sun, J. M., Volker, J. L., Galvin, K. M., Davie, J. R., Shi, Y., Hansen, U., & 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(15), 6790-6799. <https://doi.org/10.1128/jvi.74.15.6790-6799.2000>

Cribbs, S. K., Lennox, J., Caliendo, A. M., Brown, L. A., & Guidot, D. M. (2015). Healthy HIV-1-infected individuals on highly active antiretroviral therapy harbor HIV-1 in their alveolar macrophages. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 31(1), 64-70. <https://doi.org/10.1089/AID.2014.0133>

Crooks, A. M., Bateson, R., Cope, A. B., Dahl, N. P., Griggs, M. K., Kuruc, J. D., Gay, C. L., Eron, J. J., Margolis, D. M., Bosch, R. J., & Archin, N. M. (2015). Precise Quantitation of the Latent HIV-1 Reservoir: Implications for Eradication Strategies. *J Infect Dis*, 212(9), 1361-1365. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiv218>

Cullen, B. R. (1998). Retroviruses as Model Systems for the Study of Nuclear RNA Export Pathways. *Virology*, 249(2), 203-210. <https://doi.org/https://doi.org/10.1006/viro.1998.9331>

D'Souza, M., Fontenot, A. P., Mack, D. G., Lozupone, C., Dillon, S., Meditz, A., Wilson, C. C., Connick, E., & Palmer, B. E. (2007). Programmed death 1 expression on HIV-specific CD4+ T cells is driven by viral replication and associated with T cell dysfunction. *J Immunol*, 179(3), 1979-1987. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.179.3.1979>

- Dalgleish, A. G., Beverley, P. C., Clapham, P. R., Crawford, D. H., Greaves, M. F., & Weiss, R. A. (1984). The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus. *Nature*, 312(5996), 763-767. <https://doi.org/10.1038/312763a0>
- Damouche, A., Lazure, T., Avettand-Fenoel, V., Huot, N., Dejuçq-Rainsford, N., Satie, A. P., Melard, A., David, L., Gomet, C., Ghosn, J., Noel, N., Pourcher, G., Martinez, V., Benoist, S., Bereziat, V., Cosma, A., Favier, B., Vaslin, B., Rouzioux, C., . . . Bourgeois, C. (2015). Adipose Tissue Is a Neglected Viral Reservoir and an Inflammatory Site during Chronic HIV and SIV Infection. *PLoS Pathog*, 11(9), e1005153. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005153>
- Darcis, G., Kootstra, N. A., Hooibrink, B., van Montfort, T., Maurer, I., Groen, K., Jurriaans, S., Bakker, M., van Lint, C., Berkhout, B., & Pasternak, A. O. (2020). CD32(+)CD4(+) T Cells Are Highly Enriched for HIV DNA and Can Support Transcriptional Latency. *Cell Rep*, 30(7), 2284-2296 e2283. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.01.071>
- Darcis, G., Kula, A., Bouchat, S., Fujinaga, K., Corazza, F., Ait-Ammar, A., Delacourt, N., Melard, A., Kabeya, K., Vanhulle, C., Van Driessche, B., Gatot, J. S., Cherrier, T., Pianowski, L. F., Gama, L., Schwartz, C., Vila, J., Burny, A., Clumeck, N., . . . Van Lint, C. (2015). 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*, 11(7), e1005063. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005063>
- Das, A. T., Klaver, B., Klasens, B. I., van Wamel, J. L., & Berkhout, B. (1997). A conserved hairpin motif in the R-U5 region of the human immunodeficiency virus type 1 RNA genome is essential for replication. *J Virol*, 71(3), 2346-2356. <https://doi.org/10.1128/jvi.71.3.2346-2356.1997>
- Davey, R. T., Jr., Bhat, N., Yoder, C., Chun, T. W., Metcalf, J. A., Dewar, R., Natarajan, V., Lempicki, R. A., Adelsberger, J. W., Miller, K. D., Kovacs, J. A., Polis, M. A., Walker, R. E., Falloon, J., Masur, H., Gee, D., Baseler, M., Dimitrov, D. S., Fauci, A. S., & Lane, H. C. (1999). HIV-1 and T cell dynamics after interruption of highly active antiretroviral therapy (HAART) in patients with a history of sustained viral suppression. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(26), 15109-15114. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.26.15109>
- Day, C. L., Kaufmann, D. E., Kiepiela, P., Brown, J. A., Moodley, E. S., Reddy, S., Mackey, E. W., Miller, J. D., Leslie, A. J., DePierres, C., Mncube, Z., Duraiswamy, J., Zhu, B., Eichbaum, Q., Altfeld, M., Wherry, E. J., Coovadia, H. M., Goulder, P. J., Klenerman, P., . . . Walker, B. D. (2006). PD-1 expression on HIV-specific T cells is associated with T-cell exhaustion and disease progression. *Nature*, 443(7109), 350-354. <https://doi.org/10.1038/nature05115>

- De Scheerder, M. A., Vrancken, B., Dellicour, S., Schlub, T., Lee, E., Shao, W., Rutsaert, S., Verhofstede, C., Kerre, T., Malfait, T., Hemelsoet, D., Coppens, M., Dhondt, A., De Looze, D., Vermassen, F., Lemey, P., Palmer, S., & Vandekerckhove, L. (2019). HIV Rebound Is Predominantly Fueled by Genetically Identical Viral Expansions from Diverse Reservoirs. *Cell Host Microbe*, 26(3), 347-358 e347. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2019.08.003>
- Deeks, S. G., Overbaugh, J., Phillips, A., & Buchbinder, S. (2015). HIV infection. *Nat Rev Dis Primers*, 1, 15035. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2015.35>
- Deeks, S. G., & Walker, B. D. (2007). Human immunodeficiency virus controllers: mechanisms of durable virus control in the absence of antiretroviral therapy. *Immunity*, 27(3), 406-416. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2007.08.010>
- Deleage, C., Moreau, M., Rioux-Leclercq, N., Ruffault, A., Jegou, B., & Dejucq-Rainsford, N. (2011). Human immunodeficiency virus infects human seminal vesicles in vitro and in vivo. *Am J Pathol*, 179(5), 2397-2408. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2011.08.005>
- Deleage, C., Wietgreffe, S. W., Del Prete, G., Morcock, D. R., Hao, X. P., Piatak, M., Jr., Bess, J., Anderson, J. L., Perkey, K. E., Reilly, C., McCune, J. M., Haase, A. T., Lifson, J. D., Schacker, T. W., & Estes, J. D. (2016). Defining HIV and SIV Reservoirs in Lymphoid Tissues. *Pathog Immun*, 1(1), 68-106. <https://doi.org/10.20411/pai.v1i1.100>
- Delviks-Frankenberry, K., Galli, A., Nikolaitchik, O., Mens, H., Pathak, V. K., & Hu, W. S. (2011). Mechanisms and factors that influence high frequency retroviral recombination. *Viruses*, 3(9), 1650-1680. <https://doi.org/10.3390/v3091650>
- Delwart, E. L., Pan, H., Sheppard, H. W., Wolpert, D., Neumann, A. U., Korber, B., & Mullins, J. I. (1997). Slower evolution of human immunodeficiency virus type 1 quasispecies during progression to AIDS. *J Virol*, 71(10), 7498-7508. <https://doi.org/10.1128/JVI.71.10.7498-7508.1997>
- Deng, H., Liu, R., Ellmeier, W., Choe, S., Unutmaz, D., Burkhart, M., Marzio, P. D., Marmon, S., Sutton, R. E., Hill, C. M., Davis, C. B., Peiper, S. C., Schall, T. J., Littman, D. R., & Landau, N. R. (1996). Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1. *Nature*, 381(6584), 661-666. <https://doi.org/10.1038/381661a0>
- Deng, K., Perteau, M., Rongvaux, A., Wang, L., Durand, C. M., Ghiaur, G., Lai, J., McHugh, H. L., Hao, H., Zhang, H., Margolick, J. B., Gurer, C., Murphy, A. J., Valenzuela, D. M., Yancopoulos, G. D., Deeks, S. G., Strowig, T., Kumar, P., Siliciano, J. D., . . . Siliciano, R. F. (2015). Broad CTL response is required to clear latent HIV-1 due to dominance of escape mutations. *Nature*, 517(7534), 381-385. <https://doi.org/10.1038/nature14053>

- Denton, P. W., Olesen, R., Choudhary, S. K., Archin, N. M., Wahl, A., Swanson, M. D., Chateau, M., Nochi, T., Krisko, J. F., Spagnuolo, R. A., Margolis, D. M., & Garcia, J. V. (2012). Generation of HIV latency in humanized BLT mice. *J Virol*, 86(1), 630-634. <https://doi.org/10.1128/JVI.06120-11>
- DeNucci, C. C., & Shimizu, Y. (2011). 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*, 186(7), 4019-4026. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1003566>
- Descours, B., Petitjean, G., Lopez-Zaragoza, J. L., Bruel, T., Raffel, R., Psomas, C., Reynes, J., Lacabaratz, C., Levy, Y., Schwartz, O., Lelievre, J. D., & Benkirane, M. (2017). CD32a is a marker of a CD4 T-cell HIV reservoir harbouring replication-competent proviruses. *Nature*, 543(7646), 564-567. <https://doi.org/10.1038/nature21710>
- Dhillon, S. (2022). Carotegrast Methyl: First Approval. *Drugs*, 82(9), 1011-1016. <https://doi.org/10.1007/s40265-022-01732-0>
- Dickter, J., Weibel, S., Cardoso, A., Li, S., Gendzekhadze, K., Feng, Y., Dadwal, S., Taplitz, R., Ross, J., Aribi, A., Stan, R., Kidambi, T., L., L., S., C., A., C., M., A. M., J., A., Forman, S., & Zaia, J. (2022, 29 July - 2 August 2022). The 'City of Hope' Patient: prolonged HIV-1 remission without antiretrovirals (ART) after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (aHCT) of CCR5-Δ32/Δ32 donor cells for acute myelogenous leukemia (AML) [Oral abstract session]. AIDS, Montreal (Canada). <https://programme.aids2022.org/Abstract/Abstract/?abstractid=12508>
- Dimitrov, D. S., Willey, R. L., Sato, H., Chang, L. J., Blumenthal, R., & Martin, M. A. (1993). Quantitation of human immunodeficiency virus type 1 infection kinetics. *J Virol*, 67(4), 2182-2190. <https://doi.org/10.1128/JVI.67.4.2182-2190.1993>
- Domanska, U. M., Kruijzinga, R. C., Nagengast, W. B., Timmer-Bosscha, H., Huls, G., de Vries, E. G., & Walenkamp, A. M. (2013). A review on CXCR4/CXCL12 axis in oncology: no place to hide. *Eur J Cancer*, 49(1), 219-230. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2012.05.005>
- Doranz, B. J., Rucker, J., Yi, Y., Smyth, R. J., Samson, M., Peiper, S. C., Parmentier, M., Collman, R. G., & Doms, R. W. (1996). A dual-tropic primary HIV-1 isolate that uses fusin and the beta-chemokine receptors CKR-5, CKR-3, and CKR-2b as fusion cofactors. *Cell*, 85(7), 1149-1158. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81314-8](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81314-8)
- Dornadula, G., Zhang, H., VanUitert, B., Stern, J., Livornese, L., Jr., Ingerman, M. J., Witek, J., Kedanis, R. J., Natkin, J., DeSimone, J., & Pomerantz, R. J. (1999). Residual HIV-1 RNA in blood plasma of patients taking suppressive highly active antiretroviral therapy. *JAMA*, 282(17), 1627-1632. <https://doi.org/10.1001/jama.282.17.1627>

- Dragic, T., Litwin, V., Allaway, G. P., Martin, S. R., Huang, Y., Nagashima, K. A., Cayanan, C., Maddon, P. J., Koup, R. A., Moore, J. P., & Paxton, W. A. (1996). HIV-1 entry into CD4+ cells is mediated by the chemokine receptor CC-CKR-5. *Nature*, *381*(6584), 667-673. <https://doi.org/10.1038/381667a0>
- Duette, G., Hiener, B., Morgan, H., Mazur, F. G., Mathivanan, V., Horsburgh, B. A., Fisher, K., Tong, O., Lee, E., Ahn, H., Shaik, A., Fromentin, R., Hoh, R., Bacchus-Souffan, C., Nasr, N., Cunningham, A. L., Hunt, P. W., Chomont, N., Turville, S. G., . . . Palmer, S. (2022). The HIV-1 proviral landscape reveals that Nef contributes to HIV-1 persistence in effector memory CD4+ T cells. *J Clin Invest*, *132*(7). <https://doi.org/10.1172/JCI154422>
- Dufour, C., Gantner, P., Fromentin, R., & Chomont, N. (2020). The multifaceted nature of HIV latency. *J Clin Invest*, *130*(7), 3381-3390. <https://doi.org/10.1172/JCI136227>
- Dufour, C., Richard, C., Pardons, M., Massanella, M., Ackaoui, A., Murrell, B., Routy, B., Thomas, R., Routy, J. P., Fromentin, R., & Chomont, N. (2023). Phenotypic characterization of single CD4+ T cells harboring genetically intact and inducible HIV genomes. *Nat Commun*, *14*(1), 1115. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-36772-x>
- Dufour, C., Ruiz, M. J., Pagliuzza, A., Richard, C., Shahid, A., Fromentin, R., Ponte, R., Cattin, A., Wiche Salinas, T. R., Salahuddin, S., Sandstrom, T., Schinkel, S. B., Costiniuk, C. T., Jenabian, M. A., Ancuta, P., Routy, J. P., Cohen, E. A., Brumme, Z. L., Power, C., . . . Chomont, N. (2023). Near full-length HIV sequencing in multiple tissues collected postmortem reveals shared clonal expansions across distinct reservoirs during ART. *Cell Rep*, *42*(9), 113053. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2023.113053>
- Duh, E. J., Maury, W. J., Folks, T. M., Fauci, A. S., & Rabson, A. B. (1989). Tumor necrosis factor alpha activates human immunodeficiency virus type 1 through induction of nuclear factor binding to the NF-kappa B sites in the long terminal repeat. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *86*(15), 5974-5978. <https://doi.org/10.1073/pnas.86.15.5974>
- Einkauf, K. B., Lee, G. Q., Gao, C., Sharaf, R., Sun, X., Hua, S., Chen, S. M., Jiang, C., Lian, X., Chowdhury, F. Z., Rosenberg, E. S., Chun, T. W., Li, J. Z., Yu, X. G., & Lichterfeld, M. (2019). Intact HIV-1 proviruses accumulate at distinct chromosomal positions during prolonged antiretroviral therapy. *J Clin Invest*, *129*(3), 988-998. <https://doi.org/10.1172/JCI124291>
- Einkauf, K. B., Osborn, M. R., Gao, C., Sun, W., Sun, X., Lian, X., Parsons, E. M., Gladkov, G. T., Seiger, K. W., Blackmer, J. E., Jiang, C., Yukl, S. A., Rosenberg, E. S., Yu, X. G., & Lichterfeld, M. (2022). Parallel analysis of transcription, integration, and sequence of single HIV-1 proviruses. *Cell*, *185*(2), 266-282 e215. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.12.011>

- Elices, M. J., Osborn, L., Takada, Y., Crouse, C., Luhowskyj, S., Hemler, M. E., & Lobb, R. R. (1990). VCAM-1 on activated endothelium interacts with the leukocyte integrin VLA-4 at a site distinct from the VLA-4/fibronectin binding site. *Cell*, 60(4), 577-584. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(90\)90661-w](https://doi.org/10.1016/0092-8674(90)90661-w)
- Elliott, J. H., Wightman, F., Solomon, A., Ghneim, K., Ahlers, J., Cameron, M. J., Smith, M. Z., Spelman, T., McMahon, J., Velayudham, P., Brown, G., Roney, J., Watson, J., Prince, M. H., Hoy, J. F., Chomont, N., Fromentin, R., Procopio, F. A., Zeidan, J., . . . Lewin, S. R. (2014). Activation of HIV transcription with short-course vorinostat in HIV-infected patients on suppressive antiretroviral therapy. *PLoS Pathog*, 10(10), e1004473. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004473>
- Emery, A., Zhou, S., Pollom, E., & Swanstrom, R. (2017). Characterizing HIV-1 Splicing by Using Next-Generation Sequencing. *J Virol*, 91(6). <https://doi.org/10.1128/JVI.02515-16>
- Engelhardt, B., Conley, F. K., Kilshaw, P. J., & Butcher, E. C. (1995). Lymphocytes infiltrating the CNS during inflammation display a distinctive phenotype and bind to VCAM-1 but not to MAdCAM-1. *International Immunology*, 7(3), 481-491. <https://doi.org/10.1093/intimm/7.3.481>
- Enick, P. N., Brooker, J. P., Tumiotto, C. M., Staines, B. T., Eron, J. J., McMahon, D. K., Gandhi, R. T., Mellors, J. W., & Sobolewski, M. D. (2021). Comparison of methods to quantify inducible HIV-1 outgrowth. *J Virus Erad*, 7(2), 100043. <https://doi.org/10.1016/j.jve.2021.100043>
- Eriksson, S., Graf, E. H., Dahl, V., Strain, M. C., Yukl, S. A., Lysenko, E. S., Bosch, R. J., Lai, J., Chioma, S., Emad, F., Abdel-Mohsen, M., Hoh, R., Hecht, F., Hunt, P., Somsouk, M., Wong, J., Johnston, R., Siliciano, R. F., Richman, D. D., . . . Siliciano, J. D. (2013). Comparative analysis of measures of viral reservoirs in HIV-1 eradication studies. *PLoS Pathog*, 9(2), e1003174. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003174>
- Eron, J. J., Benoit, S. L., Jemsek, J., MacArthur, R. D., Santana, J., Quinn, J. B., Kuritzkes, D. R., Fallon, M. A., & Rubin, M. (1995). Treatment with Lamivudine, Zidovudine, or Both in HIV-Positive Patients with 200 to 500 CD4+ Cells per Cubic Millimeter. *New England Journal of Medicine*, 333(25), 1662-1669. <https://doi.org/10.1056/nejm199512213332502>
- Etemad, B., Sun, X., Li, Y., Melberg, M., Moisi, D., Gottlieb, R., Ahmed, H., Aga, E., Bosch, R. J., Acosta, E. P., Yuki, Y., Martin, M. P., Carrington, M., Gandhi, R. T., Jacobson, J. M., Volberding, P., Connick, E., Mitsuyasu, R., Frank, I., . . . Li, J. Z. (2023). HIV post-treatment controllers have distinct immunological and virological features. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 120(11), e2218960120. <https://doi.org/10.1073/pnas.2218960120>

- Evans, V. A., Kumar, N., Filali, A., Procopio, F. A., Yegorov, O., Goulet, J. P., Saleh, S., Haddad, E. K., da Fonseca Pereira, C., Ellenberg, P. C., Sekaly, R. P., Cameron, P. U., & Lewin, S. R. (2013). Myeloid dendritic cells induce HIV-1 latency in non-proliferating CD4+ T cells. *PLoS Pathog*, 9(12), e1003799. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003799>
- Fanales-Belasio, E., Raimondo, M., Suligoj, B., & Butto, S. (2010). HIV virology and pathogenetic mechanisms of infection: a brief overview. *Ann Ist Super Sanita*, 46(1), 5-14. https://doi.org/10.4415/ANN_10_01_02
- Feng, Y., Broder, C. C., Kennedy, P. E., & Berger, E. A. (1996). HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor. *Science*, 272(5263), 872-877. <https://doi.org/10.1126/science.272.5263.872>
- Fenwick, C., Joo, V., Jacquier, P., Noto, A., Banga, R., Perreau, M., & Pantaleo, G. (2019). T-cell exhaustion in HIV infection. *Immunol Rev*, 292(1), 149-163. <https://doi.org/10.1111/imr.12823>
- Fiebig, E. W., Wright, D. J., Rawal, B. D., Garrett, P. E., Schumacher, R. T., Peddada, L., Heldebrant, C., Smith, R., Conrad, A., Kleinman, S. H., & Busch, M. P. (2003). Dynamics of HIV viremia and antibody seroconversion in plasma donors: implications for diagnosis and staging of primary HIV infection. *AIDS*, 17(13), 1871-1879. <https://doi.org/10.1097/00002030-200309050-00005>
- Finzi, D., Hermankova, M., Pierson, T., Carruth, L. M., Buck, C., Chaisson, R. E., Quinn, T. C., Chadwick, K., Margolick, J., Brookmeyer, R., Gallant, J., Markowitz, M., Ho, D. D., Richman, D. D., & Siliciano, R. F. (1997). Identification of a reservoir for HIV-1 in patients on highly active antiretroviral therapy. *Science*, 278(5341), 1295-1300. <https://doi.org/10.1126/science.278.5341.1295>
- Fischl, M. A., Richman, D. D., Grieco, M. H., Gottlieb, M. S., Volberding, P. A., Laskin, O. L., Leedom, J. M., Groopman, J. E., Mildvan, D., Schooley, R. T., & et al. (1987). The efficacy of azidothymidine (AZT) in the treatment of patients with AIDS and AIDS-related complex. A double-blind, placebo-controlled trial. *N Engl J Med*, 317(4), 185-191. <https://doi.org/10.1056/NEJM198707233170401>
- Fletcher, C. V., Staskus, K., Wietgreffe, S. W., Rothenberger, M., Reilly, C., Chipman, J. G., Beilman, G. J., Khoruts, A., Thorkelson, A., Schmidt, T. E., Anderson, J., Perkey, K., Stevenson, M., Perelson, A. S., Douek, D. C., Haase, A. T., & Schacker, T. W. (2014). Persistent HIV-1 replication is associated with lower antiretroviral drug concentrations in lymphatic tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 111(6), 2307-2312. <https://doi.org/10.1073/pnas.1318249111>

- Fong, L., Mengozzi, M., Abbey, N. W., Herndier, B. G., & Engleman, E. G. (2002). Productive infection of plasmacytoid dendritic cells with human immunodeficiency virus type 1 is triggered by CD40 ligation. *J Virol*, 76(21), 11033-11041. <https://doi.org/10.1128/jvi.76.21.11033-11041.2002>
- Friedman, J., Cho, W. K., Chu, C. K., Keedy, K. S., Archin, N. M., Margolis, D. M., & Karn, J. (2011). Epigenetic silencing of HIV-1 by the histone H3 lysine 27 methyltransferase enhancer of Zeste 2. *J Virol*, 85(17), 9078-9089. <https://doi.org/10.1128/JVI.00836-11>
- Friedman-Kien, A. E. (1981). Disseminated Kaposi's sarcoma syndrome in young homosexual men. *J Am Acad Dermatol*, 5(4), 468-471. [https://doi.org/10.1016/s0190-9622\(81\)80010-2](https://doi.org/10.1016/s0190-9622(81)80010-2)
- Fromentin, R., Bakeman, W., Lawani, M. B., Houry, G., Hartogensis, W., DaFonseca, S., Killian, M., Epling, L., Hoh, R., Sinclair, E., Hecht, F. M., Bacchetti, P., Deeks, S. G., Lewin, S. R., Sekaly, R. P., & Chomont, N. (2016). CD4+ T Cells Expressing PD-1, TIGIT and LAG-3 Contribute to HIV Persistence during ART. *PLoS Pathog*, 12(7), e1005761. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005761>
- Fromentin, R., DaFonseca, S., Costiniuk, C. T., El-Far, M., Procopio, F. A., Hecht, F. M., Hoh, R., Deeks, S. G., Hazuda, D. J., Lewin, S. R., Routy, J. P., Sekaly, R. P., & Chomont, N. (2019). PD-1 blockade potentiates HIV latency reversal ex vivo in CD4(+) T cells from ART-suppressed individuals. *Nat Commun*, 10(1), 814. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-08798-7>
- Fujiwara, T., Oda, K., Yokota, S., Takatsuki, A., & Ikehara, Y. (1988). Brefeldin A causes disassembly of the Golgi complex and accumulation of secretory proteins in the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem*, 263(34), 18545-18552.
- Fukazawa, Y., Lum, R., Okoye, A. A., Park, H., Matsuda, K., Bae, J. Y., Hagen, S. I., Shoemaker, R., Deleage, C., Lucero, C., Morcock, D., Swanson, T., Legasse, A. W., Axthelm, M. K., Hesselgesser, J., Geleziunas, R., Hirsch, V. M., Edlefsen, P. T., Piatak, M., Jr., . . . Picker, L. J. (2015). B cell follicle sanctuary permits persistent productive simian immunodeficiency virus infection in elite controllers. *Nat Med*, 21(2), 132-139. <https://doi.org/10.1038/nm.3781>
- Gaebler, C., Falcinelli, S. D., Stoffel, E., Read, J., Murtagh, R., Oliveira, T. Y., Ramos, V., Lorenzi, J. C. C., Kirchherr, J., James, K. S., Allard, B., Baker, C., Kuruc, J. D., Caskey, M., Archin, N. M., Siliciano, R. F., Margolis, D. M., & Nussenzweig, M. C. (2021). Sequence Evaluation and Comparative Analysis of Novel Assays for Intact Proviral HIV-1 DNA. *J Virol*, 95(6). <https://doi.org/10.1128/JVI.01986-20>

- Gaebler, C., Lorenzi, J. C. C., Oliveira, T. Y., Nogueira, L., Ramos, V., Lu, C. L., Pai, J. A., Mendoza, P., Jankovic, M., Caskey, M., & Nussenzweig, M. C. (2019). Combination of quadruplex qPCR and next-generation sequencing for qualitative and quantitative analysis of the HIV-1 latent reservoir. *J Exp Med*, 216(10), 2253-2264. <https://doi.org/10.1084/jem.20190896>
- Gaebler, C., Nogueira, L., Stoffel, E., Oliveira, T. Y., Breton, G., Millard, K. G., Turroja, M., Butler, A., Ramos, V., Seaman, M. S., Reeves, J. D., Petrououlos, C. J., Shimeliovich, I., Gazumyan, A., Jiang, C. S., Jilg, N., Scheid, J. F., Gandhi, R., Walker, B. D., . . . Nussenzweig, M. C. (2022). Prolonged viral suppression with anti-HIV-1 antibody therapy. *Nature*, 606(7913), 368-374. <https://doi.org/10.1038/s41586-022-04597-1>
- Gallo, R. C., Salahuddin, S. Z., Popovic, M., Shearer, G. M., Kaplan, M., Haynes, B. F., Palker, T. J., Redfield, R., Oleske, J., Safai, B., & et al. (1984). Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS. *Science*, 224(4648), 500-503. <https://doi.org/10.1126/science.6200936>
- Galvez, C., Grau-Exposito, J., Urrea, V., Clotet, B., Falco, V., Buzon, M. J., & Martinez-Picado, J. (2021). Atlas of the HIV-1 Reservoir in Peripheral CD4 T Cells of Individuals on Successful Antiretroviral Therapy. *mBio*, 12(6), e0307821. <https://doi.org/10.1128/mBio.03078-21>
- Gandhi, R. T., Bedimo, R., Hoy, J. F., Landovitz, R. J., Smith, D. M., Eaton, E. F., Lehmann, C., Springer, S. A., Sax, P. E., Thompson, M. A., Benson, C. A., Buchbinder, S. P., Del Rio, C., Eron, J. J., Jr., Gunthard, H. F., Molina, J. M., Jacobsen, D. M., & Saag, M. S. (2023). Antiretroviral Drugs for Treatment and Prevention of HIV Infection in Adults: 2022 Recommendations of the International Antiviral Society-USA Panel. *JAMA*, 329(1), 63-84. <https://doi.org/10.1001/jama.2022.22246>
- Ganor, Y., Real, F., Sennepin, A., Dutertre, C. A., Prevedel, L., Xu, L., Tudor, D., Charmeteau, B., Couedel-Courteille, A., Marion, S., Zenak, A. R., Jourdain, J. P., Zhou, Z., Schmitt, A., Capron, C., Eugenin, E. A., Cheynier, R., Revol, M., Cristofari, S., . . . Bomsel, M. (2019). HIV-1 reservoirs in urethral macrophages of patients under suppressive antiretroviral therapy. *Nat Microbiol*, 4(4), 633-644. <https://doi.org/10.1038/s41564-018-0335-z>
- Gantner, P., Buranapraditkun, S., Pagliuzza, A., Dufour, C., Pardons, M., Mitchell, J. L., Kroon, E., Sacdalan, C., Tulmethakaan, N., Pinyakorn, S., Robb, M. L., Phanuphak, N., Ananworanich, J., Hsu, D., Vasan, S., Trautmann, L., Fromentin, R., & Chomont, N. (2023). HIV rapidly targets a diverse pool of CD4(+) T cells to establish productive and latent infections. *Immunity*, 2022.2005.2010.491275. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2023.01.030>
- Gantner, P., Pagliuzza, A., Pardons, M., Ramgopal, M., Routy, J. P., Fromentin, R., & Chomont, N. (2020). Single-cell TCR sequencing reveals phenotypically diverse clonally expanded cells

- harboring inducible HIV proviruses during ART. *Nat Commun*, 11(1), 4089. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-17898-8>
- Ganusov, V. V., & De Boer, R. J. (2007). Do most lymphocytes in humans really reside in the gut? *Trends Immunol*, 28(12), 514-518. <https://doi.org/10.1016/j.it.2007.08.009>
- Garcia, J. V., & Miller, A. D. (1991). Serine phosphorylation-independent downregulation of cell-surface CD4 by nef. *Nature*, 350(6318), 508-511. <https://doi.org/10.1038/350508a0>
- Gartner, S., Markovits, P., Markovitz, D. M., Kaplan, M. H., Gallo, R. C., & Popovic, M. (1986). The Role of Mononuclear Phagocytes in HTLV-III/LAV Infection. *Science*, 233(4760), 215-219. <https://doi.org/doi:10.1126/science.3014648>
- Gendron, K., Ferbeyre, G., Heveker, N., & Brakier-Gingras, L. (2011). The activity of the HIV-1 IRES is stimulated by oxidative stress and controlled by a negative regulatory element. *Nucleic Acids Res*, 39(3), 902-912. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq885>
- German Advisory Committee Blood, S. A. o. P. T. b. B. (2016). Human Immunodeficiency Virus (HIV). *Transfus Med Hemother*, 43(3), 203-222. <https://doi.org/10.1159/000445852>
- Gianella, S., Kosakovsky Pond, S. L., Oliveira, M. F., Scheffler, K., Strain, M. C., De la Torre, A., Letendre, S., Smith, D. M., & Ellis, R. J. (2016). Compartmentalized HIV rebound in the central nervous system after interruption of antiretroviral therapy. *Virus Evol*, 2(2), vew020. <https://doi.org/10.1093/ve/vew020>
- Gianella, S., Taylor, J., Brown, T. R., Kaytes, A., Achim, C. L., Moore, D. J., Little, S. J., Ellis, R. J., & Smith, D. M. (2017). Can research at the end of life be a useful tool to advance HIV cure? *AIDS*, 31(1), 1-4. <https://doi.org/10.1097/QAD.0000000000001300>
- Gibellini, D., Vitone, F., Schiavone, P., Ponti, C., La Placa, M., & Re, M. C. (2004). Quantitative detection of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) proviral DNA in peripheral blood mononuclear cells by SYBR green real-time PCR technique. *J Clin Virol*, 29(4), 282-289. [https://doi.org/10.1016/s1386-6532\(03\)00169-0](https://doi.org/10.1016/s1386-6532(03)00169-0)
- Gibson, D. G., Young, L., Chuang, R.-Y., Venter, J. C., Hutchison, C. A., & Smith, H. O. (2009). Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. *Nature Methods*, 6(5), 343-345. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1318>
- Golumbeanu, M., Cristinelli, S., Rato, S., Munoz, M., Cavassini, M., Beerenwinkel, N., & Ciuffi, A. (2018). Single-Cell RNA-Seq Reveals Transcriptional Heterogeneity in Latent and Reactivated HIV-Infected Cells. *Cell Rep*, 23(4), 942-950. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.03.102>

- Gondim, M. V. P., Sherrill-Mix, S., Bibollet-Ruche, F., Russell, R. M., Trimboli, S., Smith, A. G., Li, Y., Liu, W., Avitto, A. N., DeVoto, J. C., Connell, J., Fenton-May, A. E., Pellegrino, P., Williams, I., Papasavvas, E., Lorenzi, J. C. C., Salantes, D. B., Mampe, F., Monroy, M. A., . . . Hahn, B. H. (2021). Heightened resistance to host type 1 interferons characterizes HIV-1 at transmission and after antiretroviral therapy interruption. *Sci Transl Med*, 13(576). <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.abd8179>
- Gosselin, A., Wiche Salinas, T. R., Planas, D., Wacleche, V. S., Zhang, Y., Fromentin, R., Chomont, N., Cohen, E. A., Shacklett, B., Mehraj, V., Ghali, M. P., Routy, J. P., & Ancuta, P. (2017). HIV persists in CCR6+CD4+ T cells from colon and blood during antiretroviral therapy. *AIDS*, 31(1), 35-48. <https://doi.org/10.1097/QAD.0000000000001309>
- Gottlieb, M. S., Schroff, R., Schanker, H. M., Weisman, J. D., Fan, P. T., Wolf, R. A., & Saxon, A. (1981). Pneumocystis carinii pneumonia and mucosal candidiasis in previously healthy homosexual men: evidence of a new acquired cellular immunodeficiency. *N Engl J Med*, 305(24), 1425-1431. <https://doi.org/10.1056/NEJM198112103052401>
- Goulder, P. J., & Watkins, D. I. (2004). HIV and SIV CTL escape: implications for vaccine design. *Nat Rev Immunol*, 4(8), 630-640. <https://doi.org/10.1038/nri1417>
- Grant, R. M., Lama, J. R., Anderson, P. L., McMahan, V., Liu, A. Y., Vargas, L., Goicochea, P., Casapía, M., Guanira-Carranza, J. V., Ramirez-Cardich, M. E., Montoya-Herrera, O., Fernández, T., Veloso, V. G., Buchbinder, S. P., Chariyalertsak, S., Schechter, M., Bekker, L. G., Mayer, K. H., Kallás, E. G., . . . Team, i. S. (2010). Preexposure Chemoprophylaxis for HIV Prevention in Men Who Have Sex with Men. *New England Journal of Medicine*, 363(27), 2587-2599. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1011205>
- Grau-Exposito, J., Serra-Peinado, C., Miguel, L., Navarro, J., Curran, A., Burgos, J., Ocana, I., Ribera, E., Torrella, A., Planas, B., Badia, R., Castellvi, J., Falco, V., Crespo, M., & Buzon, M. J. (2017). 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*, 8(4). <https://doi.org/10.1128/mBio.00876-17>
- Gulick, R. M., Mellors, J. W., & Havlir, D. (1996, July 7-12). Potent and sustained antiretroviral activity of indinavir (IDV), zidovudine (ZDV) and lamivudine (3TC). XI International Conference on AIDS Society, Vancouver (Canada).
- Gulick, R. M., Mellors, J. W., Havlir, D., Eron, J. J., Gonzalez, C., McMahon, D., Richman, D. D., Valentine, F. T., Jonas, L., Meibohm, A., Emini, E. A., & Chodakewitz, J. A. (1997). Treatment with indinavir, zidovudine, and lamivudine in adults with human immunodeficiency virus infection and prior antiretroviral therapy. *N Engl J Med*, 337(11), 734-739. <https://doi.org/10.1056/NEJM199709113371102>

- Gunthard, H. F., Havlir, D. V., Fiscus, S., Zhang, Z. Q., Eron, J., Mellors, J., Gulick, R., Frost, S. D., Brown, A. J., Schleif, W., Valentine, F., Jonas, L., Meibohm, A., Ignacio, C. C., Isaacs, R., Gamagami, R., Emini, E., Haase, A., Richman, D. D., & Wong, J. K. (2001). Residual human immunodeficiency virus (HIV) Type 1 RNA and DNA in lymph nodes and HIV RNA in genital secretions and in cerebrospinal fluid after suppression of viremia for 2 years. *J Infect Dis*, 183(9), 1318-1327. <https://doi.org/10.1086/319864>
- Guo, S., Luke, B. T., Henry, A. R., Darko, S., Brandt, L. D., Su, L., Sun, D., Wells, D., Joseph, K. W., Demirov, D., Halvas, E. K., Douek, D. C., Wu, X., Mellors, J. W., & Hughes, S. H. (2022). HIV infected CD4+ T cell clones are more stable than uninfected clones during long-term antiretroviral therapy. *PLoS Pathog*, 18(8), e1010726. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1010726>
- Gupta, R. K., Abdul-Jawad, S., McCoy, L. E., Mok, H. P., Peppas, D., Salgado, M., Martinez-Picado, J., Nijhuis, M., Wensing, A. M. J., Lee, H., Grant, P., Nastouli, E., Lambert, J., Pace, M., Salasc, F., Monit, C., Innes, A. J., Muir, L., Waters, L., . . . Olavarria, E. (2019). HIV-1 remission following CCR5Delta32/Delta32 haematopoietic stem-cell transplantation. *Nature*, 568(7751), 244-248. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1027-4>
- Gurunathan, S., Habib, R. E., Baglyos, L., Meric, C., Plotkin, S., Dodet, B., Corey, L., & Tartaglia, J. (2009). Use of predictive markers of HIV disease progression in vaccine trials. *Vaccine*, 27(14), 1997-2015. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2009.01.039>
- Han, Y., Lassen, K., Monie, D., Sedaghat, A. R., Shimoji, S., Liu, X., Pierson, T. C., Margolick, J. B., Siliciano, R. F., & Siliciano, J. D. (2004). 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*, 78(12), 6122-6133. <https://doi.org/10.1128/JVI.78.12.6122-6133.2004>
- Haque, A., Engel, J., Teichmann, S. A., & Lonnberg, T. (2017). A practical guide to single-cell RNA-sequencing for biomedical research and clinical applications. *Genome Med*, 9(1), 75. <https://doi.org/10.1186/s13073-017-0467-4>
- Harris, R. S., Bishop, K. N., Sheehy, A. M., Craig, H. M., Petersen-Mahrt, S. K., Watt, I. N., Neuberger, M. S., & Malim, M. H. (2003). DNA Deamination Mediates Innate Immunity to Retroviral Infection. *Cell*, 113(6), 803-809. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)00423-9](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00423-9)
- Hartana, C. A., Garcia-Broncano, P., Rassadkina, Y., Lian, X., Jiang, C., Einkauf, K. B., Maswabi, K., Ajibola, G., Moyo, S., Mohammed, T., Maphorisa, C., Makhema, J., Yuki, Y., Martin, M., Bennett, K., Jean-Philippe, P., Viard, M., Hughes, M. D., Powis, K. M., . . . Lichterfeld, M.

- (2022). Immune correlates of HIV-1 reservoir cell decline in early-treated infants. *Cell Rep*, 40(3), 111126. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2022.111126>
- He, J., Choe, S., Walker, R., Di Marzio, P., Morgan, D. O., & Landau, N. R. (1995). Human immunodeficiency virus type 1 viral protein R (Vpr) arrests cells in the G2 phase of the cell cycle by inhibiting p34cdc2 activity. *J Virol*, 69(11), 6705-6711. <https://doi.org/10.1128/jvi.69.11.6705-6711.1995>
- Hemler, M. E., Huang, C., Takada, Y., Schwarz, L., Strominger, J. L., & Clabby, M. L. (1987). Characterization of the cell surface heterodimer VLA-4 and related peptides. *Journal of Biological Chemistry*, 262(24), 11478-11485. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)60831-2](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)60831-2)
- Henrich, T. J., Hanhauser, E., Marty, F. M., Sirignano, M. N., Keating, S., Lee, T. H., Robles, Y. P., Davis, B. T., Li, J. Z., Heisey, A., Hill, A. L., Busch, M. P., Armand, P., Soiffer, R. J., Altfield, M., & Kuritzkes, D. R. (2014). Antiretroviral-free HIV-1 remission and viral rebound after allogeneic stem cell transplantation: report of 2 cases. *Ann Intern Med*, 161(5), 319-327. <https://doi.org/10.7326/M14-1027>
- Hermankova, M., Ray, S. C., Ruff, C., Powell-Davis, M., Ingersoll, R., D'Aquila, R. T., Quinn, T. C., Siliciano, J. D., Siliciano, R. F., & Persaud, D. (2001). HIV-1 Drug Resistance Profiles in Children and Adults With Viral Load of <50 Copies/mL Receiving Combination Therapy. *JAMA*, 286(2), 196-207. <https://doi.org/10.1001/jama.286.2.196>
- Herrmann, C. H., & Rice, A. P. (1995). Lentivirus Tat proteins specifically associate with a cellular protein kinase, TAK, that hyperphosphorylates the carboxyl-terminal domain of the large subunit of RNA polymerase II: candidate for a Tat cofactor. *J Virol*, 69(3), 1612-1620. <https://doi.org/10.1128/jvi.69.3.1612-1620.1995>
- 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., Sinclair, E., Hoh, R., Boritz, E. A., Douek, D., Fromentin, R., Chomont, N., Deeks, S. G., Hecht, F. M., & Palmer, S. (2017). Identification of Genetically Intact HIV-1 Proviruses in Specific CD4(+) T Cells from Effectively Treated Participants. *Cell Rep*, 21(3), 813-822. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.09.081>
- Ho, D. D., Neumann, A. U., Perelson, A. S., Chen, W., Leonard, J. M., & Markowitz, M. (1995). Rapid turnover of plasma virions and CD4 lymphocytes in HIV-1 infection. *Nature*, 373(6510), 123-126. <https://doi.org/10.1038/373123a0>
- Ho, Y. C., Shan, L., Hosmane, N. N., Wang, J., Laskey, S. B., Rosenbloom, D. I., Lai, J., Blankson, J. N., Siliciano, J. D., & Siliciano, R. F. (2013). Replication-competent noninduced proviruses

in the latent reservoir increase barrier to HIV-1 cure. *Cell*, 155(3), 540-551. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.09.020>

Hogan, L. E., Vasquez, J., Hobbs, K. S., Hanhauser, E., Aguilar-Rodriguez, B., Hussien, R., Thanh, C., Gibson, E. A., Carvidi, A. B., Smith, L. C. B., Khan, S., Trapecar, M., Sanjabi, S., Somsouk, M., Stoddart, C. A., Kuritzkes, D. R., Deeks, S. G., & Henrich, T. J. (2018). Increased HIV-1 transcriptional activity and infectious burden in peripheral blood and gut-associated CD4+ T cells expressing CD30. *PLoS Pathog*, 14(2), e1006856. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006856>

Horsburgh, B. A., Lee, E., Hiener, B., Eden, J. S., Schlub, T. E., von Stockenstrom, S., Odevall, L., Milush, J. M., Liegler, T., Sinclair, E., Hoh, R., Boritz, E. A., Douek, D. C., Fromentin, R., Chomont, N., Deeks, S. G., Hecht, F. M., & Palmer, S. (2020). High levels of genetically intact HIV in HLA-DR+ memory T cells indicates their value for reservoir studies. *AIDS*, 34(5), 659-668. <https://doi.org/10.1097/QAD.0000000000002465>

Hosmane, N. N., Kwon, K. J., Bruner, K. M., Capoferri, A. A., Beg, S., Rosenbloom, D. I., Keele, B. F., Ho, Y. C., Siliciano, J. D., & Siliciano, R. F. (2017). Proliferation of latently infected CD4(+) T cells carrying replication-competent HIV-1: Potential role in latent reservoir dynamics. *J Exp Med*, 214(4), 959-972. <https://doi.org/10.1084/jem.20170193>

Hsu, D. C., Mellors, J. W., & Vasan, S. (2021). Can Broadly Neutralizing HIV-1 Antibodies Help Achieve an ART-Free Remission? *Front Immunol*, 12, 710044. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.710044>

Hsu, J., Van Besien, K., Glesby, M. J., Pahwa, S., Coletti, A., Warshaw, M. G., Petz, L., Moore, T. B., Chen, Y. H., Pallikkuth, S., Dhummakupt, A., Cortado, R., Golner, A., Bone, F., Baldo, M., Riches, M., Mellors, J. W., Tobin, N. H., Browning, R., . . . International Maternal Pediatric Adolescent, A. C. T. N. P. T. (2023). HIV-1 remission and possible cure in a woman after haplo-cord blood transplant. *Cell*, 186(6), 1115-1126 e1118. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2023.02.030>

Hu, W. S., & Hughes, S. H. (2012). HIV-1 reverse transcription. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2(10). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006882>

Huang, S.-L., Shyu, R.-Y., Yeh, M.-Y., & Jiang, S.-Y. (2000). Cloning and characterization of a novel retinoid-inducible gene 1(RIG1) deriving from human gastric cancer cells. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 159(1), 15-24. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0303-7207\(99\)00207-5](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0303-7207(99)00207-5)

Human Immunodeficiency Viruses and Human T-Cell Lymphotropic Viruses. (1996). *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum*, 67, 1-424. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9190379>

- Hunt, P. W., Martin, J. N., Sinclair, E., Bredt, B., Hagos, E., Lampiris, H., & Deeks, S. G. (2003). T cell activation is associated with lower CD4+ T cell gains in human immunodeficiency virus-infected patients with sustained viral suppression during antiretroviral therapy. *J Infect Dis*, 187(10), 1534-1543. <https://doi.org/10.1086/374786>
- Hutter, G. (2014). More on shift of HIV tropism in stem-cell transplantation with CCR5 delta32/delta32 mutation. *N Engl J Med*, 371(25), 2437-2438. <https://doi.org/10.1056/NEJMc1412279>
- Hutter, G., Nowak, D., Mossner, M., Ganepola, S., Mussig, A., Allers, K., Schneider, T., Hofmann, J., Kucherer, C., Blau, O., Blau, I. W., Hofmann, W. K., & Thiel, E. (2009). Long-term control of HIV by CCR5 Delta32/Delta32 stem-cell transplantation. *N Engl J Med*, 360(7), 692-698. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0802905>
- Huyveneers, L. E. P., Bruns, A., Stam, A., Ellerbroek, P., de Jong, D., Nagy, N. A., Gumbs, S. B. H., Tesselaar, K., Bosman, K., Salgado, M., Hutter, G., Brosens, L. A. A., Kwon, M., Diez Martin, J., van der Meer, J. T. M., de Kort, T. M., Saez-Cirion, A., Schulze Zur Wiesch, J., Boelens, J. J., . . . IciStem, C. (2022). Autopsy Study Defines Composition and Dynamics of the HIV-1 Reservoir after Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation with CCR5Delta32/Delta32 Donor Cells. *Viruses*, 14(9). <https://doi.org/10.3390/v14092069>
- Igarashi, T., Brown, C. R., Endo, Y., Buckler-White, A., Plishka, R., Bischofberger, N., Hirsch, V., & Martin, M. A. (2001). Macrophage are the principal reservoir and sustain high virus loads in rhesus macaques after the depletion of CD4+ T cells by a highly pathogenic simian immunodeficiency virus/HIV type 1 chimera (SHIV): Implications for HIV-1 infections of humans. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(2), 658-663. <https://doi.org/10.1073/pnas.98.2.658>
- Iglesias-Ussel, M., Vandergeeten, C., Marchionni, L., Chomont, N., & Romero, F. (2013). High levels of CD2 expression identify HIV-1 latently infected resting memory CD4+ T cells in virally suppressed subjects. *J Virol*, 87(16), 9148-9158. <https://doi.org/10.1128/JVI.01297-13>
- Imamichi, H., Degray, G., Dewar, R. L., Mannon, P., Yao, M., Chairez, C., Sereti, I., & Kovacs, J. A. (2011). Lack of compartmentalization of HIV-1 quasispecies between the gut and peripheral blood compartments. *J Infect Dis*, 204(2), 309-314. <https://doi.org/10.1093/infdis/jir259>
- Imamichi, H., Dewar, R. L., Adelsberger, J. W., Rehm, C. A., O'Doherty, U., Paxinos, E. E., Fauci, A. S., & Lane, H. C. (2016). 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*, 113(31), 8783-8788. <https://doi.org/10.1073/pnas.1609057113>

- Imamichi, H., Smith, M., Adelsberger, J. W., Izumi, T., Scrimieri, F., Sherman, B. T., Rehm, C. A., Imamichi, T., Pau, A., Catalfamo, M., Fauci, A. S., & Lane, H. C. (2020). Defective HIV-1 proviruses produce viral proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *117*(7), 3704-3710. <https://doi.org/10.1073/pnas.1917876117>
- International, H. I. V. C. S., Pereyra, F., Jia, X., McLaren, P. J., Telenti, A., de Bakker, P. I., Walker, B. D., Ripke, S., Brumme, C. J., Pulit, S. L., Carrington, M., Kadie, C. M., Carlson, J. M., Heckerman, D., Graham, R. R., Plenge, R. M., Deeks, S. G., Gianniny, L., Crawford, G., . . . Zhao, M. (2010). The major genetic determinants of HIV-1 control affect HLA class I peptide presentation. *Science*, *330*(6010), 1551-1557. <https://doi.org/10.1126/science.1195271>
- 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., Delfraissy, J. F., Goujard, C., & Taoufik, Y. (2014). Progressive contraction of the latent HIV reservoir around a core of less-differentiated CD4(+) memory T Cells. *Nat Commun*, *5*, 5407. <https://doi.org/10.1038/ncomms6407>
- Jambo, K. C., Banda, D. H., Kankwatira, A. M., Sukumar, N., Allain, T. J., Heyderman, R. S., Russell, D. G., & Mwandumba, H. C. (2014). Small alveolar macrophages are infected preferentially by HIV and exhibit impaired phagocytic function. *Mucosal Immunol*, *7*(5), 1116-1126. <https://doi.org/10.1038/mi.2013.127>
- Jenabian, M. A., Costiniuk, C. T., Mehraj, V., Ghazawi, F. M., Fromentin, R., Brousseau, J., Brassard, P., Belanger, M., Ancuta, P., Bendayan, R., Chomont, N., Routy, J. P., & Orchid study, g. (2016). Immune tolerance properties of the testicular tissue as a viral sanctuary site in ART-treated HIV-infected adults. *AIDS*, *30*(18), 2777-2786. <https://doi.org/10.1097/QAD.0000000000001282>
- Jensen, B. O., Knops, E., Cords, L., Lubke, N., Salgado, M., Busman-Sahay, K., Estes, J. D., Huyveneers, L. E. P., Perdomo-Celis, F., Wittner, M., Galvez, C., Mummert, C., Passaes, C., Eberhard, J. M., Munk, C., Hauber, I., Hauber, J., Heger, E., De Clercq, J., . . . Kobbe, G. (2023). In-depth virological and immunological characterization of HIV-1 cure after CCR5Delta32/Delta32 allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Nat Med*. <https://doi.org/10.1038/s41591-023-02213-x>
- Jetzt, A. E., Yu, H., Klarmann, G. J., Ron, Y., Preston, B. D., & Dougherty, J. P. (2000). High rate of recombination throughout the human immunodeficiency virus type 1 genome. *J Virol*, *74*(3), 1234-1240. <https://doi.org/10.1128/jvi.74.3.1234-1240.2000>
- Jiang, C., Lian, X., Gao, C., Sun, X., Einkauf, K. B., Chevalier, J. M., Chen, S. M. Y., Hua, S., Rhee, B., Chang, K., Blackmer, J. E., Osborn, M., Peluso, M. J., Hoh, R., Somsouk, M., Milush, J.,

- Bertagnolli, L. N., Sweet, S. E., Varriale, J. A., . . . Yu, X. G. (2020). Distinct viral reservoirs in individuals with spontaneous control of HIV-1. *Nature*, 585(7824), 261-267. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2651-8>
- Jiang, G., Mendes, E. A., Kaiser, P., Sankaran-Walters, S., Tang, Y., Weber, M. G., Melcher, G. P., Thompson, G. R., 3rd, Tanuri, A., Pianowski, L. F., Wong, J. K., & Dandekar, S. (2014). Reactivation of HIV latency by a newly modified Ingenol derivative via protein kinase Cdelta-NF-kappaB signaling. *AIDS*, 28(11), 1555-1566. <https://doi.org/10.1097/QAD.000000000000289>
- Jones, B. R., Miller, R. L., Kinloch, N. N., Tsai, O., Rigsby, H., Sudderuddin, H., Shahid, A., Ganase, B., Brumme, C. J., Harris, M., Poon, A. F. Y., Brockman, M. A., Fromentin, R., Chomont, N., Joy, J. B., & Brumme, Z. L. (2020). Genetic Diversity, Compartmentalization, and Age of HIV Proviruses Persisting in CD4(+) T Cell Subsets during Long-Term Combination Antiretroviral Therapy. *J Virol*, 94(5). <https://doi.org/10.1128/JVI.01786-19>
- Josefsson, L., von Stockenstrom, S., Faria, N. R., Sinclair, E., Bacchetti, P., Killian, M., Epling, L., Tan, A., Ho, T., Lemey, P., Shao, W., Hunt, P. W., Somsouk, M., Wylie, W., Douek, D. C., Loeb, L., Custer, J., Hoh, R., Poole, L., . . . Palmer, S. (2013). 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*, 110(51), E4987-4996. <https://doi.org/10.1073/pnas.1308313110>
- Joseph, K. W., Halvas, E. K., Brandt, L. D., Patro, S. C., Rausch, J. W., Chopra, A., Mallal, S., Kearney, M. F., Coffin, J. M., & Mellors, J. W. (2022). Deep Sequencing Analysis of Individual HIV-1 Proviruses Reveals Frequent Asymmetric Long Terminal Repeats. *J Virol*, 96(13), e0012222. <https://doi.org/10.1128/jvi.00122-22>
- Jowett, J. B., Planelles, V., Poon, B., Shah, N. P., Chen, M. L., & Chen, I. S. (1995). The human immunodeficiency virus type 1 vpr gene arrests infected T cells in the G2 + M phase of the cell cycle. *J Virol*, 69(10), 6304-6313. <https://doi.org/10.1128/jvi.69.10.6304-6313.1995>
- Kahn, J. O., & Walker, B. D. (1998). Acute human immunodeficiency virus type 1 infection. *N Engl J Med*, 339(1), 33-39. <https://doi.org/10.1056/NEJM199807023390107>
- Kandathil, A. J., Sugawara, S., Goyal, A., Durand, C. M., Quinn, J., Sachithanandham, J., Cameron, A. M., Bailey, J. R., Perelson, A. S., & Balagopal, A. (2018). No recovery of replication-competent HIV-1 from human liver macrophages. *J Clin Invest*, 128(10), 4501-4509. <https://doi.org/10.1172/JCI121678>

- Kao, S. Y., Calman, A. F., Luciw, P. A., & Peterlin, B. M. (1987). Anti-termination of transcription within the long terminal repeat of HIV-1 by tat gene product. *Nature*, *330*(6147), 489-493. <https://doi.org/10.1038/330489a0>
- Karn, J., & Stoltzfus, C. M. (2012). Transcriptional and posttranscriptional regulation of HIV-1 gene expression. *Cold Spring Harb Perspect Med*, *2*(2), a006916. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006916>
- Kartikeyan, S., Bharmal, R. N., Tiwari, R. P., & Bisen, P. S. (2007). *HIV and AIDS:: Basic Elements and Priorities*. Springer Netherlands. <https://books.google.ca/books?id=-4xbFuo6aQgC>
- Katlama, C., Ingrand, D., Loveday, C., Clumeck, N., Mallolas, J., Staszewski, S., Johnson, M., Hill, A. M., Pearce, G., & McDade, H. (1996). Safety and efficacy of lamivudine-zidovudine combination therapy in antiretroviral-naive patients. A randomized controlled comparison with zidovudine monotherapy. Lamivudine European HIV Working Group. *JAMA*, *276*(2), 118-125. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8656503>
<https://jamanetwork.com/journals/jama/article-abstract/405117>
https://jamanetwork.com/journals/jama/articlepdf/405117/jama_276_2_027.pdf
- Kauder, S. E., Bosque, A., Lindqvist, A., Planelles, V., & Verdin, E. (2009). Epigenetic regulation of HIV-1 latency by cytosine methylation. *PLoS Pathog*, *5*(6), e1000495. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000495>
- Kawakami, K., Scheidereit, C., & Roeder, R. G. (1988). Identification and purification of a human immunoglobulin-enhancer-binding protein (NF-kappa B) that activates transcription from a human immunodeficiency virus type 1 promoter in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *85*(13), 4700-4704. <https://doi.org/10.1073/pnas.85.13.4700>
- Kearney, M. F., Wiegand, A., Shao, W., Coffin, J. M., Mellors, J. W., Lederman, M., Gandhi, R. T., Keele, B. F., & Li, J. Z. (2016). Origin of Rebound Plasma HIV Includes Cells with Identical Proviruses That Are Transcriptionally Active before Stopping of Antiretroviral Therapy. *J Virol*, *90*(3), 1369-1376. <https://doi.org/10.1128/JVI.02139-15>
- Keele, B. F., Giorgi, E. E., Salazar-Gonzalez, J. F., Decker, J. M., Pham, K. T., Salazar, M. G., Sun, C., Grayson, T., Wang, S., Li, H., Wei, X., Jiang, C., Kirchherr, J. L., Gao, F., Anderson, J. A., Ping, L. H., Swanstrom, R., Tomaras, G. D., Blattner, W. A., . . . Shaw, G. M. (2008). Identification and characterization of transmitted and early founder virus envelopes in primary HIV-1 infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *105*(21), 7552-7557. <https://doi.org/10.1073/pnas.0802203105>

- Kemp, S. A., Charles, O. J., Derache, A., Smidt, W., Martin, D. P., Iwuji, C., Adamson, J., Govender, K., de Oliveira, T., Dabis, F., Pillay, D., Goldstein, R. A., & Gupta, R. K. (2022). HIV-1 Evolutionary Dynamics under Nonsuppressive Antiretroviral Therapy. *mBio*, *13*(3), e0026922. <https://doi.org/10.1128/mbio.00269-22>
- Kepler, T. B., & Perelson, A. S. (1998). Drug concentration heterogeneity facilitates the evolution of drug resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *95*(20), 11514-11519. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.20.11514>
- Kessing, C. F., Nixon, C. C., Li, C., Tsai, P., Takata, H., Mousseau, G., Ho, P. T., Honeycutt, J. B., Fallahi, M., Trautmann, L., Garcia, J. V., & Valente, S. T. (2017). In Vivo Suppression of HIV Rebound by Didehydro-Cortistatin A, a "Block-and-Lock" Strategy for HIV-1 Treatment. *Cell Rep*, *21*(3), 600-611. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.09.080>
- Kim, T. K., Billard, M. J., Wieder, E. D., McIntyre, B. W., & Komanduri, K. V. (2010). Co-engagement of alpha(4)beta(1) integrin (VLA-4) and CD4 or CD8 is necessary to induce maximal Erk1/2 phosphorylation and cytokine production in human T cells. *Hum Immunol*, *71*(1), 23-28. <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2009.09.360>
- Kinloch, N. N., Ren, Y., Conce Alberto, W. D., Dong, W., Khadka, P., Huang, S. H., Mota, T. M., Wilson, A., Shahid, A., Kirkby, D., Harris, M., Kovacs, C., Benko, E., Ostrowski, M. A., Del Rio Estrada, P. M., Wimpelberg, A., Cannon, C., Hardy, W. D., MaClaren, L., . . . Jones, R. B. (2021). HIV-1 diversity considerations in the application of the Intact Proviral DNA Assay (IPDA). *Nat Commun*, *12*(1), 165. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-20442-3>
- Kiselinova, M., Pasternak, A. O., De Spiegelaere, W., Vogelaers, D., Berkhout, B., & Vandekerckhove, L. (2014). Comparison of Droplet Digital PCR and Seminested Real-Time PCR for Quantification of Cell-Associated HIV-1 RNA. *PLoS One*, *9*(1), e85999. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0085999>
- Klatzmann, D., Champagne, E., Chamaret, S., Gruest, J., Guetard, D., Hercend, T., Gluckman, J. C., & Montagnier, L. (1984). T-lymphocyte T4 molecule behaves as the receptor for human retrovirus LAV. *Nature*, *312*(5996), 767-768. <https://doi.org/10.1038/312767a0>
- Ko, A., Kang, G., Hattler, J. B., Galadima, H. I., Zhang, J., Li, Q., & Kim, W. K. (2019). Macrophages but not Astrocytes Harbor HIV DNA in the Brains of HIV-1-Infected Aviremic Individuals on Suppressive Antiretroviral Therapy. *J Neuroimmune Pharmacol*, *14*(1), 110-119. <https://doi.org/10.1007/s11481-018-9809-2>
- Kobbe, G., Kaiser, R., Knops, E., Luebke, N., Dunay, G. A., Fischer, J., Huettig, F., Haas, R., Haeussinger, D., & Jensen, B.-E. O. (2016, February 22-25, 2016). *Treatment of HIV and AML by Allogeneic CCR5-d32 Blood Stem-Cell Transplantation* [Poster]. CROI, Boston,

Massachusetts (USA). <https://www.croiconference.org/abstract/treatment-hiv-and-aml-allogeneic-ccr5-d32-blood-stem-cell-transplantation/>

Kordelas, L., Verheyen, J., Beelen, D. W., Horn, P. A., Heinold, A., Kaiser, R., Trenchel, R., Schadendorf, D., Dittmer, U., Esser, S., & Essen, H. I. V. A. G. (2014). Shift of HIV tropism in stem-cell transplantation with CCR5 Delta32 mutation. *N Engl J Med*, *371*(9), 880-882. <https://doi.org/10.1056/NEJMc1405805>

Kulkosky, J., Culnan, D. M., Roman, J., Dornadula, G., Schnell, M., Boyd, M. R., & Pomerantz, R. J. (2001). Prostratin: activation of latent HIV-1 expression suggests a potential inductive adjuvant therapy for HAART. *Blood*, *98*(10), 3006-3015. <https://doi.org/10.1182/blood.v98.10.3006>

Kulpa, D. A., & Chomont, N. (2015). HIV persistence in the setting of antiretroviral therapy: when, where and how does HIV hide? *J Virus Erad*, *1*(2), 59-66. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26448966>

Kulpa, D. A., Talla, A., Brehm, J. H., Ribeiro, S. P., Yuan, S., Bebin-Blackwell, A. G., Miller, M., Barnard, R., Deeks, S. G., Hazuda, D., Chomont, N., & Sekaly, R. P. (2019). Differentiation into an Effector Memory Phenotype Potentiates HIV-1 Latency Reversal in CD4(+) T Cells. *J Virol*, *93*(24). <https://doi.org/10.1128/JVI.00969-19>

Kumar, A. M., Borodowsky, I., Fernandez, B., Gonzalez, L., & Kumar, M. (2007). Human immunodeficiency virus type 1 RNA Levels in different regions of human brain: quantification using real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *J Neurovirol*, *13*(3), 210-224. <https://doi.org/10.1080/13550280701327038>

Kumar, B. V., Ma, W., Miron, M., Granot, T., Guyer, R. S., Carpenter, D. J., Senda, T., Sun, X., Ho, S. H., Lerner, H., Friedman, A. L., Shen, Y., & Farber, D. L. (2017). Human Tissue-Resident Memory T Cells Are Defined by Core Transcriptional and Functional Signatures in Lymphoid and Mucosal Sites. *Cell Rep*, *20*(12), 2921-2934. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.08.078>

Kumar, N. A., Cheong, K., Powell, D. R., da Fonseca Pereira, C., Anderson, J., Evans, V. A., Lewin, S. R., & Cameron, P. U. (2015). The role of antigen presenting cells in the induction of HIV-1 latency in resting CD4(+) T-cells. *Retrovirology*, *12*, 76. <https://doi.org/10.1186/s12977-015-0204-2>

Kuniholm, J., Coote, C., & Henderson, A. J. (2022). Defective HIV-1 genomes and their potential impact on HIV pathogenesis. *Retrovirology*, *19*(1), 13. <https://doi.org/10.1186/s12977-022-00601-8>

- Kuo, H. H., Banga, R., Lee, G. Q., Gao, C., Cavassini, M., Corpataux, J. M., Blackmer, J. E., Zur Wiesch, S., Yu, X. G., Pantaleo, G., Perreau, M., & Lichtenfeld, M. (2020). Blood and Lymph Node Dissemination of Clonal Genome-Intact Human Immunodeficiency Virus 1 DNA Sequences During Suppressive Antiretroviral Therapy. *J Infect Dis*, 222(4), 655-660. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiaa137>
- Kuritzkes, D. R., Quinn, J. B., Benoit, S. L., Shugarts, D. L., Griffin, A., Bakhtiari, M., Poticha, D., Eron, J. J., Fallon, M. A., & Rubin, M. (1996). Drug resistance and virologic response in NUCA 3001, a randomized trial of lamivudine (3TC) versus zidovudine (ZDV) versus ZDV plus 3TC in previously untreated patients. *AIDS*, 10(9), 975-981. <https://doi.org/10.1097/00002030-199610090-00007>
- Kuzembayeva, M., Dilley, K., Sardo, L., & Hu, W. S. (2014). Life of psi: how full-length HIV-1 RNAs become packaged genomes in the viral particles. *Virology*, 454-455, 362-370. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2014.01.019>
- Lambotte, O., Taoufik, Y., de Goer, M. G., Wallon, C., Goujard, C., & Delfraissy, J. F. (2000). Detection of infectious HIV in circulating monocytes from patients on prolonged highly active antiretroviral therapy. *J Acquir Immune Defic Syndr*, 23(2), 114-119. <https://doi.org/10.1097/00126334-200002010-00002>
- Lamers, S. L., Rose, R., Maidji, E., Agsalda-Garcia, M., Nolan, D. J., Fogel, G. B., Salemi, M., Garcia, D. L., Bracci, P., Yong, W., Commins, D., Said, J., Khanlou, N., Hinkin, C. H., Sueiras, M. V., Mathisen, G., Donovan, S., Shiramizu, B., Stoddart, C. A., . . . Singer, E. J. (2016). HIV DNA Is Frequently Present within Pathologic Tissues Evaluated at Autopsy from Combined Antiretroviral Therapy-Treated Patients with Undetectable Viral Loads. *J Virol*, 90(20), 8968-8983. <https://doi.org/10.1128/JVI.00674-16>
- Lan, P., Tonomura, N., Shimizu, A., Wang, S., & Yang, Y. G. (2006). Reconstitution of a functional human immune system in immunodeficient mice through combined human fetal thymus/liver and CD34+ cell transplantation. *Blood*, 108(2), 487-492. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-11-4388>
- Larder, B. A., & Kemp, S. D. (1989). Multiple mutations in HIV-1 reverse transcriptase confer high-level resistance to zidovudine (AZT). *Science*, 246(4934), 1155-1158. <https://doi.org/10.1126/science.2479983>
- Laskey, S. B., Pohlmeier, C. W., Bruner, K. M., & Siliciano, R. F. (2016). Evaluating Clonal Expansion of HIV-Infected Cells: Optimization of PCR Strategies to Predict Clonality. *PLoS Pathog*, 12(8), e1005689. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005689>

- Lassen, K. G., Bailey, J. R., & Siliciano, R. F. (2004). Analysis of human immunodeficiency virus type 1 transcriptional elongation in resting CD4⁺ T cells in vivo. *J Virol*, 78(17), 9105-9114. <https://doi.org/10.1128/JVI.78.17.9105-9114.2004>
- Lee, E., von Stockenstrom, S., Morcilla, V., Odevall, L., Hiener, B., Shao, W., Hartogensis, W., Bacchetti, P., Milush, J., Liegler, T., Sinclair, E., Hatano, H., Hoh, R., Somsouk, M., Hunt, P., Boritz, E., Douek, D., Fromentin, R., Chomont, N., . . . Palmer, S. (2020). Impact of Antiretroviral Therapy Duration on HIV-1 Infection of T Cells within Anatomic Sites. *J Virol*, 94(3). <https://doi.org/10.1128/JVI.01270-19>
- Lee, G. Q., Orlova-Fink, N., Einkauf, K., Chowdhury, F. Z., Sun, X., Harrington, S., Kuo, H. H., Hua, S., Chen, H. R., Ouyang, Z., Reddy, K., Dong, K., Ndung'u, T., Walker, B. D., Rosenberg, E. S., Yu, X. G., & Lichterfeld, M. (2017). Clonal expansion of genome-intact HIV-1 in functionally polarized Th1 CD4⁺ T cells. *J Clin Invest*, 127(7), 2689-2696. <https://doi.org/10.1172/JCI93289>
- Lenasi, T., Contreras, X., & Peterlin, B. M. (2008). Transcriptional interference antagonizes proviral gene expression to promote HIV latency. *Cell Host Microbe*, 4(2), 123-133. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2008.05.016>
- Leonard, J., Parrott, C., Buckler-White, A. J., Turner, W., Ross, E. K., Martin, M. A., & Rabson, A. B. (1989). The NF-kappa B binding sites in the human immunodeficiency virus type 1 long terminal repeat are not required for virus infectivity. *J Virol*, 63(11), 4919-4924. <https://doi.org/10.1128/jvi.63.11.4919-4924.1989>
- Lewin, S. R., Vesanen, M., Kostrikis, L., Hurley, A., Duran, M., Zhang, L., Ho, D. D., & Markowitz, M. (1999). Use of real-time PCR and molecular beacons to detect virus replication in human immunodeficiency virus type 1-infected individuals on prolonged effective antiretroviral therapy. *J Virol*, 73(7), 6099-6103. <https://doi.org/10.1128/jvi.73.7.6099-6103.1999>
- Leyre, L., Kroon, E., Vandergeeten, C., Sacdalan, C., Colby, D. J., Buranapraditkun, S., Schuetz, A., Chomchey, N., de Souza, M., Bakeman, W., Fromentin, R., Pinyakorn, S., Akapirat, S., Trichavaroj, R., Chottanapund, S., Manasnayakorn, S., Rerknimitr, R., Wattanaboonyoungcharoen, P., Kim, J. H., . . . Rv254/Search, R. V. S. S. s. g. (2020). Abundant HIV-infected cells in blood and tissues are rapidly cleared upon ART initiation during acute HIV infection. *Sci Transl Med*, 12(533). <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aav3491>
- Li, C., Burdick, R. C., Nagashima, K., Hu, W. S., & Pathak, V. K. (2021). HIV-1 cores retain their integrity until minutes before uncoating in the nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 118(10). <https://doi.org/10.1073/pnas.2019467118>

- Li, C., Lai, C. F., Sigman, D. S., & Gaynor, R. B. (1991). Cloning of a cellular factor, interleukin binding factor, that binds to NFAT-like motifs in the human immunodeficiency virus long terminal repeat. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88(17), 7739-7743. <https://doi.org/10.1073/pnas.88.17.7739>
- Li, C., Mousseau, G., & Valente, S. T. (2019). Tat inhibition by didehydro-Cortistatin A promotes heterochromatin formation at the HIV-1 long terminal repeat. *Epigenetics Chromatin*, 12(1), 23. <https://doi.org/10.1186/s13072-019-0267-8>
- Li, G., Wang, Y., & De Clercq, E. (2022). Approved HIV reverse transcriptase inhibitors in the past decade. *Acta Pharm Sin B*, 12(4), 1567-1590. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2021.11.009>
- Li, J. Z., & Blankson, J. N. (2021). How elite controllers and posttreatment controllers inform our search for an HIV-1 cure. *J Clin Invest*, 131(11). <https://doi.org/10.1172/JCI149414>
- Li, J. Z., Etemad, B., Ahmed, H., Aga, E., Bosch, R. J., Mellors, J. W., Kuritzkes, D. R., Lederman, M. M., Para, M., & Gandhi, R. T. (2016). The size of the expressed HIV reservoir predicts timing of viral rebound after treatment interruption. *AIDS*, 30(3), 343-353. <https://doi.org/10.1097/QAD.0000000000000953>
- Li, P., Kaiser, P., Lampiris, H. W., Kim, P., Yukl, S. A., Havlir, D. V., Greene, W. C., & Wong, J. K. (2016). Stimulating the RIG-I pathway to kill cells in the latent HIV reservoir following viral reactivation. *Nat Med*, 22(7), 807-811. <https://doi.org/10.1038/nm.4124>
- Li, X., Liu, Z., Li, Q., Hu, R., Zhao, L., Yang, Y., Zhao, J., Huang, Z., Gao, H., Li, L., Cai, W., & Deng, K. (2019). CD161(+) CD4(+) T Cells Harbor Clonally Expanded Replication-Competent HIV-1 in Antiretroviral Therapy-Suppressed Individuals. *mBio*, 10(5). <https://doi.org/10.1128/mBio.02121-19>
- Lian, X., Gao, C., Sun, X., Jiang, C., Einkauf, K. B., Seiger, K. W., Chevalier, J. M., Yuki, Y., Martin, M., Hoh, R., Peluso, M. J., Carrington, M., Ruiz-Mateos, E., Deeks, S. G., Rosenberg, E. S., Walker, B. D., Lichterfeld, M., & Yu, X. G. (2021). Signatures of immune selection in intact and defective proviruses distinguish HIV-1 elite controllers. *Sci Transl Med*, 13(624), eabl4097. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.abl4097>
- Lian, X., Seiger, K. W., Parsons, E. M., Gao, C., Sun, W., Gladkov, G. T., Roseto, I. C., Einkauf, K. B., Osborn, M. R., Chevalier, J. M., Jiang, C., Blackmer, J., Carrington, M., Rosenberg, E. S., Lederman, M. M., McMahon, D. K., Bosch, R. J., Jacobson, J. M., Gandhi, R. T., . . . Lichterfeld, M. (2023). Progressive transformation of the HIV-1 reservoir cell profile over two decades of antiviral therapy. *Cell Host Microbe*, 31(1), 83-96 e85. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2022.12.002>

- Lim, S. Y., Osuna, C. E., Hraber, P. T., Hesselgesser, J., Gerold, J. M., Barnes, T. L., Sanisetty, S., Seaman, M. S., Lewis, M. G., Geleziunas, R., Miller, M. D., Cihlar, T., Lee, W. A., Hill, A. L., & Whitney, J. B. (2018). TLR7 agonists induce transient viremia and reduce the viral reservoir in SIV-infected rhesus macaques on antiretroviral therapy. *Sci Transl Med*, *10*(439). <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aao4521>
- Link, J. O., Rhee, M. S., Tse, W. C., Zheng, J., Somoza, J. R., Rowe, W., Begley, R., Chiu, A., Mulato, A., Hansen, D., Singer, E., Tsai, L. K., Bam, R. A., Chou, C. H., Canales, E., Brizgys, G., Zhang, J. R., Li, J., Graupe, M., . . . Cihlar, T. (2020). Clinical targeting of HIV capsid protein with a long-acting small molecule. *Nature*, *584*(7822), 614-618. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2443-1>
- Liu, F., Fan, X., Auclair, S., Ferguson, M., Sun, J., Soong, L., Hou, W., Redfield, R. R., Birx, D. L., Ratto-Kim, S., Robb, M. L., Kim, J. H., Michael, N. L., & Hu, H. (2016). Sequential Dysfunction and Progressive Depletion of Candida albicans-Specific CD4 T Cell Response in HIV-1 Infection. *PLoS Pathog*, *12*(6), e1005663. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005663>
- Liu, R., Paxton, W. A., Choe, S., Ceradini, D., Martin, S. R., Horuk, R., MacDonald, M. E., Stuhlmann, H., Koup, R. A., & Landau, N. R. (1996). Homozygous defect in HIV-1 coreceptor accounts for resistance of some multiply-exposed individuals to HIV-1 infection. *Cell*, *86*(3), 367-377. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)80110-5](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80110-5)
- Liu, R., Simonetti, F. R., & Ho, Y. C. (2020). The forces driving clonal expansion of the HIV-1 latent reservoir. *Virology*, *17*(1), 4. <https://doi.org/10.1186/s12985-019-1276-8>
- Liu, R., Yeh, Y. J., Varabyou, A., Collora, J. A., Sherrill-Mix, S., Talbot, C. C., Jr., Mehta, S., Albrecht, K., Hao, H., Zhang, H., Pollack, R. A., Beg, S. A., Calvi, R. M., Hu, J., Durand, C. M., Ambinder, R. F., Hoh, R., Deeks, S. G., Chiarella, J., . . . Ho, Y. C. (2020). Single-cell transcriptional landscapes reveal HIV-1-driven aberrant host gene transcription as a potential therapeutic target. *Sci Transl Med*, *12*(543). <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aaz0802>
- Liu, Z., Julius, P., Kang, G., West, J. T., & Wood, C. (2022). Subtype C HIV-1 reservoirs throughout the body in ART-suppressed individuals. *JCI Insight*, *7*(20). <https://doi.org/10.1172/jci.insight.162604>
- Lodi, S., Meyer, L., Kelleher, A. D., Rosinska, M., Ghosn, J., Sannes, M., & Porter, K. (2012). Immunovirologic control 24 months after interruption of antiretroviral therapy initiated close to HIV seroconversion. *Arch Intern Med*, *172*(16), 1252-1255. <https://doi.org/10.1001/archinternmed.2012.2719>

- Lorenzi, J. C., Cohen, Y. Z., Cohn, L. B., Kreider, E. F., Barton, J. P., Learn, G. H., Oliveira, T., Lavine, C. L., Horwitz, J. A., Settler, A., Jankovic, M., Seaman, M. S., Chakraborty, A. K., Hahn, B. H., Caskey, M., & Nussenzweig, M. C. (2016). 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*, *113*(49), E7908-E7916. <https://doi.org/10.1073/pnas.1617789113>
- Lorenzo-Redondo, R., Fryer, H. R., Bedford, T., Kim, E. Y., Archer, J., Pond, S. L. K., Chung, Y. S., Penugonda, S., Chipman, J., Fletcher, C. V., Schacker, T. W., Malim, M. H., Rambaut, A., Haase, A. T., McLean, A. R., & Wolinsky, S. M. (2016). Persistent HIV-1 replication maintains the tissue reservoir during therapy. *Nature*, *530*(7588), 51-56. <https://doi.org/10.1038/nature16933>
- Lu, C. L., Pai, J. A., Nogueira, L., Mendoza, P., Gruell, H., Oliveira, T. Y., Barton, J., Lorenzi, J. C. C., Cohen, Y. Z., Cohn, L. B., Klein, F., Caskey, M., Nussenzweig, M. C., & Jankovic, M. (2018). Relationship between intact HIV-1 proviruses in circulating CD4(+) T cells and rebound viruses emerging during treatment interruption. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *115*(48), E11341-E11348. <https://doi.org/10.1073/pnas.1813512115>
- Lukashov, V. V., Kuiken, C. L., & Goudsmit, J. (1995). Intrahost human immunodeficiency virus type 1 evolution is related to length of the immunocompetent period. *J Virol*, *69*(11), 6911-6916. <https://doi.org/10.1128/JVI.69.11.6911-6916.1995>
- Lusic, M., Marcello, A., Cereseto, A., & Giacca, M. (2003). Regulation of HIV-1 gene expression by histone acetylation and factor recruitment at the LTR promoter. *EMBO J*, *22*(24), 6550-6561. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdg631>
- Luznik, L., Kraus, G., Guatelli, J., Richman, D., & Wong-Staal, F. (1995). Tat-independent replication of human immunodeficiency viruses. *J Clin Invest*, *95*(1), 328-332. <https://doi.org/10.1172/JCI117660>
- Lyles, R. H., Munoz, A., Yamashita, T. E., Bazmi, H., Detels, R., Rinaldo, C. R., Margolick, J. B., Phair, J. P., & Mellors, J. W. (2000). Natural history of human immunodeficiency virus type 1 viremia after seroconversion and proximal to AIDS in a large cohort of homosexual men. Multicenter AIDS Cohort Study. *J Infect Dis*, *181*(3), 872-880. <https://doi.org/10.1086/315339>
- Maldarelli, F., Palmer, S., King, M. S., Wiegand, A., Polis, M. A., Mican, J., Kovacs, J. A., Davey, R. T., Rock-Kress, D., Dewar, R., Liu, S., Metcalf, J. A., Rehm, C., Brun, S. C., Hanna, G. J., Kempf, D. J., Coffin, J. M., & Mellors, J. W. (2007). ART suppresses plasma HIV-1 RNA to a stable set point predicted by pretherapy viremia. *PLoS Pathog*, *3*(4), e46. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0030046>

- Maldarelli, F., Wu, X., Su, L., Simonetti, F. R., Shao, W., Hill, S., Spindler, J., Ferris, A. L., Mellors, J. W., Kearney, M. F., Coffin, J. M., & Hughes, S. H. (2014). Specific HIV integration sites are linked to clonal expansion and persistence of infected cells. *Science*, *345*(6193), 179-183. <https://doi.org/10.1126/science.1254194>
- Malim, M. H., Hauber, J., Le, S.-Y., Maizel, J. V., & Cullen, B. R. (1989). The HIV-1 rev trans-activator acts through a structured target sequence to activate nuclear export of unspliced viral mRNA. *Nature*, *338*(6212), 254-257. <https://doi.org/10.1038/338254a0>
- Mansky, L. M., & Temin, H. M. (1995). Lower in vivo mutation rate of human immunodeficiency virus type 1 than that predicted from the fidelity of purified reverse transcriptase. *J Virol*, *69*(8), 5087-5094. <https://doi.org/10.1128/JVI.69.8.5087-5094.1995>
- Martus, G., Niehrs, A., Cornelis, R., Rechten, A., Garcia-Beltran, W., Lutgehetmann, M., Hoffmann, C., & Altfeld, M. (2016). Kinetics of HIV-1 Latency Reversal Quantified on the Single-Cell Level Using a Novel Flow-Based Technique. *J Virol*, *90*(20), 9018-9028. <https://doi.org/10.1128/JVI.01448-16>
- Massanella, M., Dufour, C., Pagliuzza, A., Richard, C., Ananworanich, J., Leyre, L., Jupimai, T., Mitchell, J. L., Sawangsinth, P., de Souza, M., Suntarattiwong, P., Chokeyhaibulkit, K., Trautmann, L., Puthanakit, T., Fromentin, R., & Chomont, N. (en préparation). Inducibility, cellular distribution and genetic intactness of HIV proviruses in early treated Thai children.
- Massanella, M., Fromentin, R., & Chomont, N. (2016). Residual inflammation and viral reservoirs: alliance against an HIV cure. *Curr Opin HIV AIDS*, *11*(2), 234-241. <https://doi.org/10.1097/COH.0000000000000230>
- Massanella, M., Gianella, S., Lada, S. M., Richman, D. D., & Strain, M. C. (2015). Quantification of Total and 2-LTR (Long terminal repeat) HIV DNA, HIV RNA and Herpesvirus DNA in PBMCs. *Bio Protoc*, *5*(11). <https://doi.org/10.21769/bioprotoc.1492>
- Massanella, M., Ignacio, R. A. B., Lama, J. R., Pagliuzza, A., Dasgupta, S., Alfaro, R., Rios, J., Ganoza, C., Pinto-Santini, D., Gilada, T., Duerr, A., & Chomont, N. (2021). Long-term effects of early antiretroviral initiation on HIV reservoir markers: a longitudinal analysis of the MERLIN clinical study. *Lancet Microbe*, *2*(5), e198-e209. [https://doi.org/10.1016/s2666-5247\(21\)00010-0](https://doi.org/10.1016/s2666-5247(21)00010-0)
- Massanella, M., Puthanakit, T., Leyre, L., Jupimai, T., Sawangsinth, P., de Souza, M., Suntarattiwong, P., Kosalaraksa, P., Borkird, T., Kanjanavanit, S., Chokeyhaibulkit, K., Hansudewechakul, R., Petdachai, W., Mitchell, J. L., Robb, M. L., Trautmann, L., Ananworanich, J., Chomont, N., Rv474/Hivnat, & Groups, R. H. S. (2021). Continuous Prophylactic Antiretrovirals/Antiretroviral Therapy Since Birth Reduces Seeding and

- Persistence of the Viral Reservoir in Children Vertically Infected With Human Immunodeficiency Virus. *Clin Infect Dis*, 73(3), 427-438. <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa718>
- Massanella, M., & Richman, D. D. (2016). Measuring the latent reservoir in vivo. *J Clin Invest*, 126(2), 464-472. <https://doi.org/10.1172/JCI80567>
- Mbondji-Wonje, C., Dong, M., Wang, X., Zhao, J., Ragupathy, V., Sanchez, A. M., Denny, T. N., & Hewlett, I. (2018). Distinctive variation in the U3R region of the 5' Long Terminal Repeat from diverse HIV-1 strains. *PLoS One*, 13(4), e0195661. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0195661>
- McArthur, J. C., Steiner, J., Sacktor, N., & Nath, A. (2010). Human immunodeficiency virus-associated neurocognitive disorders: Mind the gap. *Ann Neurol*, 67(6), 699-714. <https://doi.org/10.1002/ana.22053>
- McBride, M. S., & Panganiban, A. T. (1996). The human immunodeficiency virus type 1 encapsidation site is a multipartite RNA element composed of functional hairpin structures. *J Virol*, 70(5), 2963-2973. <https://doi.org/10.1128/jvi.70.5.2963-2973.1996>
- McGary, C. S., Deleage, C., Harper, J., Micci, L., Ribeiro, S. P., Paganini, S., Kuri-Cervantes, L., Benne, C., Ryan, E. S., Balderas, R., Jean, S., Easley, K., Marconi, V., Silvestri, G., Estes, J. D., Sekaly, R. P., & Paiardini, M. (2017). CTLA-4(+)PD-1(-) Memory CD4(+) T Cells Critically Contribute to Viral Persistence in Antiretroviral Therapy-Suppressed, SIV-Infected Rhesus Macaques. *Immunity*, 47(4), 776-788 e775. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2017.09.018>
- McManus, W. R., Bale, M. J., Spindler, J., Wiegand, A., Musick, A., Patro, S. C., Sobolewski, M. D., Musick, V. K., Anderson, E. M., Cyktor, J. C., Halvas, E. K., Shao, W., Wells, D., Wu, X., Keele, B. F., Milush, J. M., Hoh, R., Mellors, J. W., Hughes, S. H., . . . Kearney, M. F. (2019). HIV-1 in lymph nodes is maintained by cellular proliferation during antiretroviral therapy. *J Clin Invest*, 129(11), 4629-4642. <https://doi.org/10.1172/JCI126714>
- McMichael, A. J., Borrow, P., Tomaras, G. D., Goonetilleke, N., & Haynes, B. F. (2010). The immune response during acute HIV-1 infection: clues for vaccine development. *Nat Rev Immunol*, 10(1), 11-23. <https://doi.org/10.1038/nri2674>
- Mediouni, S., Lyu, S., Schader, S. M., & Valente, S. T. (2022). Forging a Functional Cure for HIV: Transcription Regulators and Inhibitors. *Viruses*, 14(9). <https://doi.org/10.3390/v14091980>

- Mehla, R., Bivalkar-Mehla, S., Zhang, R., Handy, I., Albrecht, H., Giri, S., Nagarkatti, P., Nagarkatti, M., & Chauhan, A. (2010). Bryostatins modulates latent HIV-1 infection via PKC and AMPK signaling but inhibits acute infection in a receptor independent manner. *PLoS One*, 5(6), e11160. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0011160>
- Mellors, J. W., Guo, S., Naqvi, A., Brandt, L. D., Su, L., Sun, Z., Joseph, K. W., Demirov, D., Halvas, E. K., Butcher, D., Scott, B., Hamilton, A., Heil, M., Karim, B., Wu, X., & Hughes, S. H. (2021). Insertional activation of STAT3 and LCK by HIV-1 proviruses in T cell lymphomas. *Sci Adv*, 7(42), eabi8795. <https://doi.org/10.1126/sciadv.abi8795>
- Mendoza, P., Jackson, J. R., Oliveira, T. Y., Gaebler, C., Ramos, V., Caskey, M., Jankovic, M., Nussenzweig, M. C., & Cohn, L. B. (2020). Antigen-responsive CD4+ T cell clones contribute to the HIV-1 latent reservoir. *J Exp Med*, 217(7). <https://doi.org/10.1084/jem.20200051>
- Mexas, A. M., Graf, E. H., Pace, M. J., Yu, J. J., Papasavvas, E., Azzoni, L., Busch, M. P., Di Mascio, M., Foulkes, A. S., Migueles, S. A., Montaner, L. J., & O'Doherty, U. (2012). Concurrent measures of total and integrated HIV DNA monitor reservoirs and ongoing replication in eradication trials. *AIDS*, 26(18), 2295-2306. <https://doi.org/10.1097/QAD.0b013e32835a5c2f>
- Meziane, O., Salahuddin, S., Pham, T. N. Q., Farnos, O., Pagliuzza, A., Olivenstein, R., Thomson, E., Alexandrova, Y., Orlova, M., Schurr, E., Ancuta, P., Haddad, E., Chomont, N., Cohen, E. A., Jenabian, M. A., & Costiniuk, C. T. (2020). HIV Infection and Persistence in Pulmonary Mucosal Double Negative T Cells In Vivo. *J Virol*, 94(24). <https://doi.org/10.1128/JVI.01788-20>
- Mighell, A. J., Markham, A. F., & Robinson, P. A. (1997). Alu sequences. *FEBS Letters*, 417(1), 1-5. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(97\)01259-3](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0014-5793(97)01259-3)
- Miller, J. S., Davis, Z. B., Helgeson, E., Reilly, C., Thorkelson, A., Anderson, J., Lima, N. S., Jorstad, S., Hart, G. T., Lee, J. H., Safrit, J. T., Wong, H., Cooley, S., Gharu, L., Chung, H., Soon-Shiong, P., Dobrowolski, C., Fletcher, C. V., Karn, J., . . . Schacker, T. W. (2022). Safety and virologic impact of the IL-15 superagonist N-803 in people living with HIV: a phase 1 trial. *Nat Med*, 28(2), 392-400. <https://doi.org/10.1038/s41591-021-01651-9>
- Miller, R. L., Ponte, R., Jones, B. R., Kinloch, N. N., Omondi, F. H., Jenabian, M. A., Dupuy, F. P., Fromentin, R., Brassard, P., Mehraj, V., Chomont, N., Poon, A. F. Y., Joy, J. B., Brumme, Z. L., Routy, J. P., & Group, O. S. (2019). HIV Diversity and Genetic Compartmentalization in Blood and Testes during Suppressive Antiretroviral Therapy. *J Virol*, 93(17). <https://doi.org/10.1128/JVI.00755-19>

- Mimitou, E. P., Lareau, C. A., Chen, K. Y., Zorzetto-Fernandes, A. L., Hao, Y., Takeshima, Y., Luo, W., Huang, T. S., Yeung, B. Z., Papalexli, E., Thakore, P. I., Kibayashi, T., Wing, J. B., Hata, M., Satija, R., Nador, K. L., Sakaguchi, S., Ludwig, L. S., Sankaran, V. G., . . . Smibert, P. (2021). Scalable, multimodal profiling of chromatin accessibility, gene expression and protein levels in single cells. *Nat Biotechnol*, *39*(10), 1246-1258. <https://doi.org/10.1038/s41587-021-00927-2>
- Miron, M., Meng, W., Rosenfeld, A. M., Dvorkin, S., Poon, M. M. L., Lam, N., Kumar, B. V., Louzoun, Y., Luning Prak, E. T., & Farber, D. L. (2021). Maintenance of the human memory T cell repertoire by subset and tissue site. *Genome Med*, *13*(1), 100. <https://doi.org/10.1186/s13073-021-00918-7>
- Mitsuya, H., Weinhold, K. J., Furman, P. A., St Clair, M. H., Lehrman, S. N., Gallo, R. C., Bolognesi, D., Barry, D. W., & Broder, S. (1985). 3'-Azido-3'-deoxythymidine (BW A509U): an antiviral agent that inhibits the infectivity and cytopathic effect of human T-lymphotropic virus type III/lymphadenopathy-associated virus in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *82*(20), 7096-7100. <https://doi.org/10.1073/pnas.82.20.7096>
- Modrow, S., Falke, D., Truyen, U., & Schätzl, H. (2013). Viruses: Definition, Structure, Classification. *Molecular Virology*. https://doi.org/10.1007/978-3-642-20718-1_2
- Mousseau, G., Kessing, C. F., Fromentin, R., Trautmann, L., Chomont, N., & Valente, S. T. (2015). The Tat Inhibitor Didehydro-Cortistatin A Prevents HIV-1 Reactivation from Latency. *mBio*, *6*(4), e00465. <https://doi.org/10.1128/mBio.00465-15>
- Murchu, E. O., Marshall, L., Teljeur, C., Harrington, P., Hayes, C., Moran, P., & Ryan, M. (2022). Oral pre-exposure prophylaxis (PrEP) to prevent HIV: a systematic review and meta-analysis of clinical effectiveness, safety, adherence and risk compensation in all populations. *BMJ Open*, *12*(5), e048478. <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2020-048478>
- Murphy, K. C., W.; Janeway, C. (2017). *Janeway's Immunobiology* (Garland Science ed.).
- Musick, A., Spindler, J., Boritz, E., Perez, L., Crespo-Velez, D., Patro, S. C., Sobolewski, M. D., Bale, M. J., Reid, C., Keele, B. F., Capoferri, A., Shao, W., Wiegand, A., Simonetti, F. R., Mellors, J. W., Hughes, S. H., Coffin, J. M., Maldarelli, F., & Kearney, M. F. (2019). HIV Infected T Cells Can Proliferate in vivo Without Inducing Expression of the Integrated Provirus. *Front Microbiol*, *10*, 2204. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02204>
- Nabel, G., & Baltimore, D. (1987). An inducible transcription factor activates expression of human immunodeficiency virus in T cells. *Nature*, *326*(6114), 711-713. <https://doi.org/10.1038/326711a0>

- Namazi, G., Fajnzylber, J. M., Aga, E., Bosch, R. J., Acosta, E. P., Sharaf, R., Hartogensis, W., Jacobson, J. M., Connick, E., Volberding, P., Skiest, D., Margolis, D., Sneller, M. C., Little, S. J., Gianella, S., Smith, D. M., Kuritzkes, D. R., Gulick, R. M., Mellors, J. W., . . . Li, J. Z. (2018). The Control of HIV After Antiretroviral Medication Pause (CHAMP) Study: Posttreatment Controllers Identified From 14 Clinical Studies. *J Infect Dis*, 218(12), 1954-1963. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiy479>
- National Center for Immunization and Respiratory Diseases (NCIRD), D. o. V. D.-C. (2023, 2023-10-04). *People Who Are Immunocompromised*. Retrieved 2023-10-30 from <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/need-extra-precautions/people-who-are-immunocompromised.html>
- Nau, R., Sorgel, F., & Eiffert, H. (2010). Penetration of drugs through the blood-cerebrospinal fluid/blood-brain barrier for treatment of central nervous system infections. *Clin Microbiol Rev*, 23(4), 858-883. <https://doi.org/10.1128/CMR.00007-10>
- Neidleman, J., Luo, X., Frouard, J., Xie, G., Hsiao, F., Ma, T., Morcilla, V., Lee, A., Telwatte, S., Thomas, R., Tamaki, W., Wheeler, B., Hoh, R., Somsouk, M., Vohra, P., Milush, J., James, K. S., Archin, N. M., Hunt, P. W., . . . Roan, N. R. (2020). Phenotypic analysis of the unstimulated in vivo HIV CD4 T cell reservoir. *Elife*, 9. <https://doi.org/10.7554/eLife.60933>
- Neil, S. J. D., Zang, T., & Bieniasz, P. D. (2008). Tetherin inhibits retrovirus release and is antagonized by HIV-1 Vpu. *Nature*, 451(7177), 425-430. <https://doi.org/10.1038/nature06553>
- Nicoll, M. P., Hann, W., Shivkumar, M., Harman, L. E., Connor, V., Coleman, H. M., Proenca, J. T., & Efstathiou, S. (2016). The HSV-1 Latency-Associated Transcript Functions to Repress Latent Phase Lytic Gene Expression and Suppress Virus Reactivation from Latently Infected Neurons. *PLoS Pathog*, 12(4), e1005539. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005539>
- Niessl, J., Baxter, A. E., Mendoza, P., Jankovic, M., Cohen, Y. Z., Butler, A. L., Lu, C. L., Dube, M., Shimeliovich, I., Gruell, H., Klein, F., Caskey, M., Nussenzweig, M. C., & Kaufmann, D. E. (2020). Combination anti-HIV-1 antibody therapy is associated with increased virus-specific T cell immunity. *Nat Med*, 26(2), 222-227. <https://doi.org/10.1038/s41591-019-0747-1>
- Nolan, D. J., Rose, R., Rodriguez, P. H., Salemi, M., Singer, E. J., Lamers, S. L., & McGrath, M. S. (2018). The Spleen Is an HIV-1 Sanctuary During Combined Antiretroviral Therapy. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 34(1), 123-125. <https://doi.org/10.1089/AID.2017.0254>
- Novembre, J., Galvani, A. P., & Slatkin, M. (2005). The geographic spread of the CCR5 Delta32 HIV-resistance allele. *PLoS Biol*, 3(11), e339. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0030339>

- Nyberg, M., Suni, J., & Haltia, M. (1990). Isolation of human immunodeficiency virus (HIV) at autopsy one to six days postmortem. *Am J Clin Pathol*, 94(4), 422-425. <https://doi.org/10.1093/ajcp/94.4.422>
- Ocwieja, K. E., Sherrill-Mix, S., Mukherjee, R., Custers-Allen, R., David, P., Brown, M., Wang, S., Link, D. R., Olson, J., Travers, K., Schadt, E., & Bushman, F. D. (2012). Dynamic regulation of HIV-1 mRNA populations analyzed by single-molecule enrichment and long-read sequencing. *Nucleic Acids Res*, 40(20), 10345-10355. <https://doi.org/10.1093/nar/gks753>
- Offersen, R., Nissen, S. K., Rasmussen, T. A., Ostergaard, L., Denton, P. W., Sogaard, O. S., & Tolstrup, M. (2016). A Novel Toll-Like Receptor 9 Agonist, MGN1703, Enhances HIV-1 Transcription and NK Cell-Mediated Inhibition of HIV-1-Infected Autologous CD4+ T Cells. *J Virol*, 90(9), 4441-4453. <https://doi.org/10.1128/JVI.00222-16>
- Olson, A., Basukala, B., Lee, S., Gagne, M., Wong, W. W., & Henderson, A. J. (2020). Targeted Chromatinization and Repression of HIV-1 Provirus Transcription with Repurposed CRISPR/Cas9. *Viruses*, 12(10). <https://doi.org/10.3390/v12101154>
- Omenetti, S., Bussi, C., Metidji, A., Iseppon, A., Lee, S., Tolaini, M., Li, Y., Kelly, G., Chakravarty, P., Shoaie, S., Gutierrez, M. G., & Stockinger, B. (2019). The Intestine Harbors Functionally Distinct Homeostatic Tissue-Resident and Inflammatory Th17 Cells. *Immunity*, 51(1), 77-89.e76. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.05.004>
- Omrani, A. S., & Freedman, A. (2005). Prophylaxis of HIV infection. *Br Med Bull*, 73-74, 93-105. <https://doi.org/10.1093/bmb/ldh053>
- Ono, A. (2010). HIV-1 assembly at the plasma membrane. *Vaccine*, 28 Suppl 2, B55-59. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2009.10.021>
- Organization, W. H. (2022a, 2022, July 27). *HIV - Key facts*. World Health Organization (WHO). Retrieved September 30 from <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/hiv-aids>
- Organization, W. H. (2022b). *HIV/AIDS - Overview*. World Health Organization (WHO). Retrieved September 28 from https://www.who.int/health-topics/hiv-aids#tab=tab_1
- Osborn, L., Hession, C., Tizard, R., Vassallo, C., Lühowskyj, S., Chi-Rosso, G., & Lobb, R. (1989). Direct expression cloning of vascular cell adhesion molecule 1, a cytokine-induced endothelial protein that binds to lymphocytes. *Cell*, 59(6), 1203-1211. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(89\)90775-7](https://doi.org/10.1016/0092-8674(89)90775-7)

- Owen, J. A., Punt, J., Stranford, S. A., Jones, P. P., & Kuby, J. (2013). *Kuby Immunology, 7th Edition* (7th ed.). W.H. Freeman. <https://books.google.ca/books?id=-JgatAEACAAJ>
- Pache, L., Dutra, M. S., Spivak, A. M., Marlett, J. M., Murry, J. P., Hwang, Y., Maestre, A. M., Manganaro, L., Vamos, M., Teriete, P., Martins, L. J., Konig, R., Simon, V., Bosque, A., Fernandez-Sesma, A., Cosford, N. D., Bushman, F. D., Young, J. A., Planelles, V., & Chanda, S. K. (2015). 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*, *18*(3), 345-353. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2015.08.009>
- Pagani, I., Ghezzi, S., Vicenzi, E., & Poli, G. (2022). The Long and Winding Road Towards an HIV Cure. *New Microbiol*, *45*(1), 1-8. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/35403842>
- Palella, F. J., Delaney, K. M., Moorman, A. C., Loveless, M. O., Fuhrer, J., Satten, G. A., Aschman, D. J., & Holmberg, S. D. (1998). Declining Morbidity and Mortality among Patients with Advanced Human Immunodeficiency Virus Infection. *New England Journal of Medicine*, *338*(13), 853-860. <https://doi.org/10.1056/nejm199803263381301>
- Palmer, S., Maldarelli, F., Wiegand, A., Bernstein, B., Hanna, G. J., Brun, S. C., Kempf, D. J., Mellors, J. W., Coffin, J. M., & 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*(10), 3879-3884. <https://doi.org/10.1073/pnas.0800050105>
- Pan, X., Urban, A. E., Palejev, D., Schulz, V., Grubert, F., Hu, Y., Snyder, M., & Weissman, S. M. (2008). A procedure for highly specific, sensitive, and unbiased whole-genome amplification. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *105*(40), 15499-15504. <https://doi.org/10.1073/pnas.0808028105>
- Pantaleo, G., Graziosi, C., Demarest, J. F., Butini, L., Montroni, M., Fox, C. H., Orenstein, J. M., Kotler, D. P., & Fauci, A. S. (1993). HIV infection is active and progressive in lymphoid tissue during the clinically latent stage of disease. *Nature*, *362*(6418), 355-358. <https://doi.org/10.1038/362355a0>
- Pardons, M., Baxter, A. E., Massanella, M., Pagliuzza, A., Fromentin, R., Dufour, C., Leyre, L., Routy, J. P., Kaufmann, D. E., & Chomont, N. (2019). Single-cell characterization and quantification of translation-competent viral reservoirs in treated and untreated HIV infection. *PLoS Pathog*, *15*(2), e1007619. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007619>
- Pardons, M., Fromentin, R., Pagliuzza, A., Routy, J. P., & Chomont, N. (2019). Latency-Reversing Agents Induce Differential Responses in Distinct Memory CD4 T Cell Subsets in Individuals on Antiretroviral Therapy. *Cell Rep*, *29*(9), 2783-2795 e2785. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.10.101>

- Parisi, S. G., Andreis, S., Mengoli, C., Scaggiante, R., Ferretto, R., Manfrin, V., Cruciani, M., Giobbia, M., Boldrin, C., Basso, M., Andreoni, M., Palu, G., & Sarmati, L. (2012). Baseline cellular HIV DNA load predicts HIV DNA decline and residual HIV plasma levels during effective antiretroviral therapy. *J Clin Microbiol*, *50*(2), 258-263. <https://doi.org/10.1128/JCM.06022-11>
- Pasternak, A. O., Adema, K. W., Bakker, M., Jurriaans, S., Berkhout, B., Cornelissen, M., & Lukashov, V. V. (2008). Highly sensitive methods based on seminested real-time reverse transcription-PCR for quantitation of human immunodeficiency virus type 1 unspliced and multiply spliced RNA and proviral DNA. *J Clin Microbiol*, *46*(7), 2206-2211. <https://doi.org/10.1128/jcm.00055-08>
- Pasternak, A. O., & Berkhout, B. (2023). HIV persistence: silence or resistance? *Curr Opin Virol*, *59*, 101301. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2023.101301>
- Patro, S. C., Brandt, L. D., Bale, M. J., Halvas, E. K., Joseph, K. W., Shao, W., Wu, X., Guo, S., Murrell, B., Wiegand, A., Spindler, J., Raley, C., Hautman, C., Sobolewski, M., Fennessey, C. M., Hu, W. S., Luke, B., Hasson, J. M., Niyongabo, A., . . . Kearney, M. F. (2019). Combined HIV-1 sequence and integration site analysis informs viral dynamics and allows reconstruction of replicating viral ancestors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *116*(51), 25891-25899. <https://doi.org/10.1073/pnas.1910334116>
- Peluso, M. J., Bacchetti, P., Ritter, K. D., Beg, S., Lai, J., Martin, J. N., Hunt, P. W., Henrich, T. J., Siliciano, J. D., Siliciano, R. F., Laird, G. M., & Deeks, S. G. (2020). Differential decay of intact and defective proviral DNA in HIV-1-infected individuals on suppressive antiretroviral therapy. *JCI Insight*, *5*(4). <https://doi.org/10.1172/jci.insight.132997>
- Perelson, A. S., Essunger, P., Cao, Y., Vesanen, M., Hurley, A., Saksela, K., Markowitz, M., & Ho, D. D. (1997). Decay characteristics of HIV-1-infected compartments during combination therapy. *Nature*, *387*(6629), 188-191. <https://doi.org/10.1038/387188a0>
- Perelson, A. S., Neumann, A. U., Markowitz, M., Leonard, J. M., & Ho, D. D. (1996). HIV-1 dynamics in vivo: virion clearance rate, infected cell life-span, and viral generation time. *Science*, *271*(5255), 1582-1586. <https://doi.org/10.1126/science.271.5255.1582>
- Perreau, M., Savoye, A. L., De Crignis, E., Corpataux, J. M., Cubas, R., Haddad, E. K., De Leval, L., Graziosi, C., & Pantaleo, G. (2013). Follicular helper T cells serve as the major CD4 T cell compartment for HIV-1 infection, replication, and production. *J Exp Med*, *210*(1), 143-156. <https://doi.org/10.1084/jem.20121932>

- Phillips, A., Lee, C. A., Elford, J., Janossy, G., Bofill, M., Timms, A., & Kernoff, P. B. (1989). Prediction of progression to AIDS by analysis of CD4 lymphocyte counts in a haemophilic cohort. *AIDS*, 3(11), 737-741. <https://doi.org/10.1097/00002030-198911000-00008>
- Phillips, R. E., Rowland-Jones, S., Nixon, D. F., Gotch, F. M., Edwards, J. P., Ogunlesi, A. O., Elvin, J. G., Rothbard, J. A., Bangham, C. R., Rizza, C. R., & et al. (1991). Human immunodeficiency virus genetic variation that can escape cytotoxic T cell recognition. *Nature*, 354(6353), 453-459. <https://doi.org/10.1038/354453a0>
- Pierson, T., Hoffman, T. L., Blankson, J., Finzi, D., Chadwick, K., Margolick, J. B., Buck, C., Siliciano, J. D., Doms, R. W., & Siliciano, R. F. (2000). Characterization of chemokine receptor utilization of viruses in the latent reservoir for human immunodeficiency virus type 1. *J Virol*, 74(17), 7824-7833. <https://doi.org/10.1128/jvi.74.17.7824-7833.2000>
- Pierson, T. C., Kieffer, T. L., Ruff, C. T., Buck, C., Gange, S. J., & Siliciano, R. F. (2002). Intrinsic stability of episomal circles formed during human immunodeficiency virus type 1 replication. *J Virol*, 76(8), 4138-4144. <https://doi.org/10.1128/jvi.76.8.4138-4144.2002>
- Piketty, C., Weiss, L., Assoumou, L., Burgard, M., Mélard, A., Ragnaud, J.-M., Bentata, M., Girard, P.-M., Rouzioux, C., Costagliola, D., & Group, t. A. S. S. (2010). A high HIV DNA level in PBMCs at antiretroviral treatment interruption predicts a shorter time to treatment resumption, independently of the CD4 nadir. *Journal of Medical Virology*, 82(11), 1819-1828. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/jmv.21907>
- Pinzone, M. R., VanBelzen, D. J., Weissman, S., Bertuccio, M. P., Cannon, L., Venanzi-Rullo, E., Migueles, S., Jones, R. B., Mota, T., Joseph, S. B., Groen, K., Pasternak, A. O., Hwang, W. T., Sherman, B., Vourekas, A., Nunnari, G., & O'Doherty, U. (2019). Longitudinal HIV sequencing reveals reservoir expression leading to decay which is obscured by clonal expansion. *Nat Commun*, 10(1), 728. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-08431-7>
- Plantin, J., Massanella, M., & Chomont, N. (2018). Inducible HIV RNA transcription assays to measure HIV persistence: pros and cons of a compromise. *Retrovirology*, 15(1), 9. <https://doi.org/10.1186/s12977-017-0385-y>
- Pollack, R. A., Jones, R. B., Perteza, M., Bruner, K. M., Martin, A. R., Thomas, A. S., Capoferri, A. A., Beg, S. A., Huang, S. H., Karandish, S., Hao, H., Halper-Stromberg, E., Yong, P. C., Kovacs, C., Benko, E., Siliciano, R. F., & Ho, Y. C. (2017). Defective HIV-1 Proviruses Are Expressed and Can Be Recognized by Cytotoxic T Lymphocytes, which Shape the Proviral Landscape. *Cell Host Microbe*, 21(4), 494-506 e494. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2017.03.008>
- Polman, C. H., O'Connor, P. W., Havrdova, E., Hutchinson, M., Kappos, L., Miller, D. H., Phillips, J. T., Lublin, F. D., Giovannoni, G., Wajgt, A., Toal, M., Lynn, F., Panzara, M. A., Sandrock, A.

- W., & Investigators, A. (2006). A randomized, placebo-controlled trial of natalizumab for relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med*, 354(9), 899-910. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa044397>
- Porichis, F., Hart, M. G., Griesbeck, M., Everett, H. L., Hassan, M., Baxter, A. E., Lindqvist, M., Miller, S. M., Soghoian, D. Z., Kavanagh, D. G., Reynolds, S., Norris, B., Mordecai, S. K., Nguyen, Q., Lai, C., & Kaufmann, D. E. (2014). High-throughput detection of miRNAs and gene-specific mRNA at the single-cell level by flow cytometry. *Nat Commun*, 5, 5641. <https://doi.org/10.1038/ncomms6641>
- Procopio, F. A., Fromentin, R., Kulpa, D. A., Brehm, J. H., Bebin, A. G., Strain, M. C., Richman, D. D., O'Doherty, U., Palmer, S., Hecht, F. M., Hoh, R., Barnard, R. J., Miller, M. D., Hazuda, D. J., Deeks, S. G., Sekaly, R. P., & Chomont, N. (2015). A Novel Assay to Measure the Magnitude of the Inducible Viral Reservoir in HIV-infected Individuals. *EBioMedicine*, 2(8), 874-883. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2015.06.019>
- Purcell, D. F., & Martin, M. A. (1993). Alternative splicing of human immunodeficiency virus type 1 mRNA modulates viral protein expression, replication, and infectivity. *J Virol*, 67(11), 6365-6378. <https://doi.org/10.1128/JVI.67.11.6365-6378.1993>
- Ramratnam, B., Mittler, J. E., Zhang, L., Boden, D., Hurley, A., Fang, F., Macken, C. A., Perelson, A. S., Markowitz, M., & Ho, D. D. (2000). The decay of the latent reservoir of replication-competent HIV-1 is inversely correlated with the extent of residual viral replication during prolonged anti-retroviral therapy. *Nat Med*, 6(1), 82-85. <https://doi.org/10.1038/71577>
- Ramroodi, N., Khani, M., Ganjali, Z., Javan, M. R., Sanadgol, N., Khalseh, R., Ravan, H., Sanadgol, E., & Abdollahi, M. (2015). Prophylactic Effect of BIO-1211 Small-Molecule Antagonist of VLA-4 in the EAE Mouse Model of Multiple Sclerosis. *Immunological Investigations*, 44(7), 694-712. <https://doi.org/10.3109/08820139.2015.1085391>
- Rasmussen, T. A., Rajdev, L., Rhodes, A., Dantanarayana, A., Tennakoon, S., Chea, S., Spelman, T., Lensing, S., Rutishauser, R., Bakkour, S., Busch, M., Siliciano, J. D., Siliciano, R. F., Einstein, M. H., Dittmer, D. P., Chiao, E., Deeks, S. G., Durand, C., & Lewin, S. R. (2021). Impact of Anti-PD-1 and Anti-CTLA-4 on the Human Immunodeficiency Virus (HIV) Reservoir in People Living With HIV With Cancer on Antiretroviral Therapy: The AIDS Malignancy Consortium 095 Study. *Clin Infect Dis*, 73(7), e1973-e1981. <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa1530>
- Rasmussen, T. A., Schmeltz Sogaard, O., Brinkmann, C., Wightman, F., Lewin, S. R., Melchjorsen, J., Dinarello, C., Ostergaard, L., & Tolstrup, M. (2013). Comparison of HDAC inhibitors in clinical development: effect on HIV production in latently infected cells and T-cell activation. *Hum Vaccin Immunother*, 9(5), 993-1001. <https://doi.org/10.4161/hv.23800>

- Rasmussen, T. A., Tolstrup, M., Brinkmann, C. R., Olesen, R., Erikstrup, C., Solomon, A., Winckelmann, A., Palmer, S., Dinarello, C., Buzon, M., Lichterfeld, M., Lewin, S. R., Ostergaard, L., & Sogaard, O. S. (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(1), e13-21. [https://doi.org/10.1016/S2352-3018\(14\)70014-1](https://doi.org/10.1016/S2352-3018(14)70014-1)
- Rato, S., Rausell, A., Munoz, M., Telenti, A., & Ciuffi, A. (2017). Single-cell analysis identifies cellular markers of the HIV permissive cell. *PLoS Pathog*, 13(10), e1006678. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006678>
- Re, F., Braaten, D., Franke, E. K., & Luban, J. (1995). Human immunodeficiency virus type 1 Vpr arrests the cell cycle in G2 by inhibiting the activation of p34cdc2-cyclin B. *J Virol*, 69(11), 6859-6864. <https://doi.org/10.1128/jvi.69.11.6859-6864.1995>
- Reeves, D. B., Duke, E. R., Wagner, T. A., Palmer, S. E., Spivak, A. M., & Schiffer, J. T. (2018). A majority of HIV persistence during antiretroviral therapy is due to infected cell proliferation. *Nat Commun*, 9(1), 4811. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-06843-5>
- Ren, Y., Huang, S. H., Patel, S., Alberto, W. D. C., Magat, D., Ahimovic, D., Macedo, A. B., Durga, R., Chan, D., Zale, E., Mota, T. M., Truong, R., Rohwetter, T., McCann, C. D., Kovacs, C. M., Benko, E., Wimpelberg, A., Cannon, C., Hardy, W. D., . . . Jones, R. B. (2020). BCL-2 antagonism sensitizes cytotoxic T cell-resistant HIV reservoirs to elimination ex vivo. *J Clin Invest*, 130(5), 2542-2559. <https://doi.org/10.1172/JCI132374>
- Research, U. S. D. *The Last Gift Study: UC San Diego Research: Tissue Donation for HIV Research*. Retrieved 2023-01-11 from <http://lastgift.ucsd.edu>
- Riou, C., Yassine-Diab, B., Van grevenynghe, J., Somogyi, R., Greller, L. D., Gagnon, D., Gimmig, S., Wilkinson, P., Shi, Y., Cameron, M. J., Campos-Gonzalez, R., Balderas, R. S., Kelvin, D., Sekaly, R. P., & Haddad, E. K. (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(1), 79-91. <https://doi.org/10.1084/jem.20061681>
- Rodger, A. J., Cambiano, V., Bruun, T., Vernazza, P., Collins, S., Degen, O., Corbelli, G. M., Estrada, V., Geretti, A. M., Beloukas, A., Raben, D., Coll, P., Antinori, A., Nwokolo, N., Rieger, A., Prins, J. M., Blaxhult, A., Weber, R., Van Eeden, A., . . . Group, P. S. (2019). Risk of HIV transmission through condomless sex in serodifferent gay couples with the HIV-positive partner taking suppressive antiretroviral therapy (PARTNER): final results of a multicentre, prospective, observational study. *Lancet*, 393(10189), 2428-2438. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(19\)30418-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(19)30418-0)

- Rose, R., Lamers, S. L., Nolan, D. J., Maidji, E., Faria, N. R., Pybus, O. G., Dollar, J. J., Maruniak, S. A., McAvoy, A. C., Salemi, M., Stoddart, C. A., Singer, E. J., & McGrath, M. S. (2016). HIV Maintains an Evolving and Dispersed Population in Multiple Tissues during Suppressive Combined Antiretroviral Therapy in Individuals with Cancer. *J Virol*, *90*(20), 8984-8993. <https://doi.org/10.1128/JVI.00684-16>
- Rosen, E. P., Deleage, C., White, N., Sykes, C., Brands, C., Adamson, L., Luciw, P., Estes, J. D., & Kashuba, A. D. M. (2022). Antiretroviral drug exposure in lymph nodes is heterogeneous and drug dependent. *J Int AIDS Soc*, *25*(4), e25895. <https://doi.org/10.1002/jia2.25895>
- Rosenbloom, D. I., Elliott, O., Hill, A. L., Henrich, T. J., Siliciano, J. M., & Siliciano, R. F. (2015). Designing and Interpreting Limiting Dilution Assays: General Principles and Applications to the Latent Reservoir for Human Immunodeficiency Virus-1. *Open Forum Infect Dis*, *2*(4), ofv123. <https://doi.org/10.1093/ofid/ofv123>
- Rosenbloom, D. I. S., Hill, A. L., Laskey, S. B., & Siliciano, R. F. (2017). Re-evaluating evolution in the HIV reservoir. *Nature*, *551*(7681), E6-E9. <https://doi.org/10.1038/nature24634>
- Ross, E. K., Buckler-White, A. J., Rabson, A. B., Englund, G., & Martin, M. A. (1991). Contribution of NF-kappa B and Sp1 binding motifs to the replicative capacity of human immunodeficiency virus type 1: distinct patterns of viral growth are determined by T-cell types. *J Virol*, *65*(8), 4350-4358. <https://doi.org/10.1128/jvi.65.8.4350-4358.1991>
- Rothenberger, M. K., Keele, B. F., Wietgreffe, S. W., Fletcher, C. V., Beilman, G. J., Chipman, J. G., Khoruts, A., Estes, J. D., Anderson, J., Callisto, S. P., Schmidt, T. E., Thorkelson, A., Reilly, C., Perkey, K., Reimann, T. G., Utay, N. S., Nganou Makamdop, K., Stevenson, M., Douek, D. C., . . . Schacker, T. W. (2015). Large number of rebounding/founder HIV variants emerge from multifocal infection in lymphatic tissues after treatment interruption. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *112*(10), E1126-1134. <https://doi.org/10.1073/pnas.1414926112>
- Rouzioux, C., Hubert, J. B., Burgard, M., Deveau, C., Goujard, C., Bary, M., Séréni, D., Viard, J. P., Delfraissy, J. F., & Meyer, L. (2005). Early levels of HIV-1 DNA in peripheral blood mononuclear cells are predictive of disease progression independently of HIV-1 RNA levels and CD4+ T cell counts. *J Infect Dis*, *192*(1), 46-55. <https://doi.org/10.1086/430610>
- Russell, S. (2020). *Timothy Ray Brown, who inspired millions living with HIV, dies of leukemia*. Retrieved 2023-01-20 from <https://www.fredhutch.org/en/news/center-news/2020/09/timothy-ray-brown-obit.html>
- Saez-Cirion, A., Bacchus, C., Hocqueloux, L., Avettand-Fenoel, V., Girault, I., Lecuroux, C., Potard, V., Versmisse, P., Melard, A., Prazuck, T., Descours, B., Guernon, J., Viard, J. P., Boufassa, F., Lambotte, O., Goujard, C., Meyer, L., Costagliola, D., Venet, A., . . . Group, A. V. S. (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(3), e1003211. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003211>

Salazar-Gonzalez, J. F., Salazar, M. G., Keele, B. F., Learn, G. H., Giorgi, E. E., Li, H., Decker, J. M., Wang, S., Baalwa, J., Kraus, M. H., Parrish, N. F., Shaw, K. S., Guffey, M. B., Bar, K. J., Davis, K. L., Ochsenbauer-Jambor, C., Kappes, J. C., Saag, M. S., Cohen, M. S., . . . Shaw, G. M. (2009). Genetic identity, biological phenotype, and evolutionary pathways of transmitted/founder viruses in acute and early HIV-1 infection. *J Exp Med*, 206(6), 1273-1289. <https://doi.org/10.1084/jem.20090378>

Samri, A., Bacchus-Souffan, C., Hocqueloux, L., Avettand-Fenoel, V., Descours, B., Theodorou, I., Larsen, M., Saez-Cirion, A., Rouzioux, C., Autran, B., & group, A. V. s. (2016). Polyfunctional HIV-specific T cells in Post-Treatment Controllers. *AIDS*, 30(15), 2299-2302. <https://doi.org/10.1097/QAD.0000000000001195>

Samson, M., Libert, F., Doranz, B. J., Rucker, J., Liesnard, C., Farber, C.-M., Saragosti, S., Lapoumèroulie, C., Cognaux, J., Forcille, C., Muyldermans, G., Verhofstede, C., Burtonboy, G., Georges, M., Imai, T., Rana, S., Yi, Y., Smyth, R. J., Collman, R. G., . . . Parmentier, M. (1996). Resistance to HIV-1 infection in Caucasian individuals bearing mutant alleles of the CCR-5 chemokine receptor gene. *Nature*, 382(6593), 722-725. <https://doi.org/10.1038/382722a0>

Sánchez-Gaona, N., Gallego Cortés, A., Astorga Gamaza, A., Rallón, N., Benito, J. M., Falcó, V., Genescà, M., & Buzón, M. J. (2022, February 12-16, 2022). *Characterization of NK cells in elite controllers losing HIV control* [Poster]. CROI, Virtual. <https://www.croiconference.org/abstract/characterization-of-nk-cells-in-elite-controllers-losing-hiv-control/>

Sannier, G., Dube, M., Dufour, C., Richard, C., Brassard, N., Delgado, G. G., Pagliuzza, A., Baxter, A. E., Niessl, J., Brunet-Ratnasingham, E., Charlebois, R., Routy, B., Routy, J. P., Fromentin, R., Chomont, N., & Kaufmann, D. E. (2021). Combined single-cell transcriptional, translational, and genomic profiling reveals HIV-1 reservoir diversity. *Cell Rep*, 36(9), 109643. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.109643>

Sato, T., Tachibana, K., Nojima, Y., D'Avirro, N., & Morimoto, C. (1995). Role of the VLA-4 molecule in T cell costimulation. Identification of the tyrosine phosphorylation pattern induced by the ligation of VLA-4. *J Immunol*, 155(6), 2938-2947. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7673711>

- Schaerli, P., Willimann, K., Lang, A. B., Lipp, M., Loetscher, P., & Moser, B. (2000). CXC chemokine receptor 5 expression defines follicular homing T cells with B cell helper function. *J Exp Med*, 192(11), 1553-1562. <https://doi.org/10.1084/jem.192.11.1553>
- Schröder, A. R., Shinn, P., Chen, H., Berry, C., Ecker, J. R., & Bushman, F. (2002). HIV-1 integration in the human genome favors active genes and local hotspots. *Cell*, 110(4), 521-529. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(02\)00864-4](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(02)00864-4)
- Schwartz, O., Maréchal, V., Le Gall, S., Lemonnier, F., & Heard, J. M. (1996). Endocytosis of major histocompatibility complex class I molecules is induced by the HIV-1 Nef protein. *Nat Med*, 2(3), 338-342. <https://doi.org/10.1038/nm0396-338>
- Scientific, T. *Spectral Flow Cytometry Fundamentals*. Retrieved 2023-01-05 from <https://www.thermofisher.com/ca/en/home/life-science/cell-analysis/flow-cytometry/flow-cytometry-learning-center/flow-cytometry-resource-library/flow-cytometry-methods/spectral-flow-cytometry-fundamentals.html>
- Segal-Maurer, S., DeJesus, E., Stellbrink, H. J., Castagna, A., Richmond, G. J., Sinclair, G. I., Siripassorn, K., Ruane, P. J., Berhe, M., Wang, H., Margot, N. A., Dvory-Sobol, H., Hyland, R. H., Brainard, D. M., Rhee, M. S., Baeten, J. M., Molina, J. M., & Investigators, C. S. (2022). Capsid Inhibition with Lenacapavir in Multidrug-Resistant HIV-1 Infection. *N Engl J Med*, 386(19), 1793-1803. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2115542>
- SenGupta, D., Brinson, C., DeJesus, E., Mills, A., Shalit, P., Guo, S., Cai, Y., Wallin, J. J., Zhang, L., Humeniuk, R., Begley, R., Geleziunas, R., Mellors, J., Wrin, T., Jones, N., Milush, J., Ferre, A. L., Shacklett, B. L., Laird, G. M., . . . Deeks, S. G. (2021). The TLR7 agonist vesatolimod induced a modest delay in viral rebound in HIV controllers after cessation of antiretroviral therapy. *Sci Transl Med*, 13(599). <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.abg3071>
- Sengupta, S., & Siliciano, R. F. (2018). Targeting the Latent Reservoir for HIV-1. *Immunity*, 48(5), 872-895. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.04.030>
- Serra-Peinado, C., Grau-Exposito, J., Luque-Ballesteros, L., Astorga-Gamaza, A., Navarro, J., Gallego-Rodriguez, J., Martin, M., Curran, A., Burgos, J., Ribera, E., Raventos, B., Willekens, R., Torrella, A., Planas, B., Badia, R., Garcia, F., Castellvi, J., Genesca, M., Falco, V., & Buzon, M. J. (2019). Expression of CD20 after viral reactivation renders HIV-reservoir cells susceptible to Rituximab. *Nat Commun*, 10(1), 3705. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-11556-4>
- Shan, L., Deng, K., Shroff, N. S., Durand, C. M., Rabi, S. A., Yang, H. C., Zhang, H., Margolick, J. B., Blankson, J. N., & Siliciano, R. F. (2012). Stimulation of HIV-1-specific cytolytic T

- lymphocytes facilitates elimination of latent viral reservoir after virus reactivation. *Immunity*, 36(3), 491-501. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2012.01.014>
- Shaw, G. M., & Hunter, E. (2012). HIV transmission. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2(11). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006965>
- Sheehy, A. M., Gaddis, N. C., Choi, J. D., & Malim, M. H. (2002). Isolation of a human gene that inhibits HIV-1 infection and is suppressed by the viral Vif protein. *Nature*, 418(6898), 646-650. <https://doi.org/10.1038/nature00939>
- Shen, R., Richter, H. E., Clements, R. H., Novak, L., Huff, K., Bimczok, D., Sankaran-Walters, S., Dandekar, S., Clapham, P. R., Smythies, L. E., & Smith, P. D. (2009). Macrophages in vaginal but not intestinal mucosa are monocyte-like and permissive to human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Virol*, 83(7), 3258-3267. <https://doi.org/10.1128/JVI.01796-08>
- Sheridan, P. L., Mayall, T. P., Verdin, E., & Jones, K. A. (1997). Histone acetyltransferases regulate HIV-1 enhancer activity in vitro. *Genes Dev*, 11(24), 3327-3340. <https://doi.org/10.1101/gad.11.24.3327>
- Shimizu, N., Tanaka, A., Oue, A., Mori, T., Ohtsuki, T., Apichartpiyakul, C., Uchiumi, H., Nojima, Y., & Hoshino, H. (2009). Broad usage spectrum of G protein-coupled receptors as coreceptors by primary isolates of HIV. *AIDS*, 23(7), 761-769. <https://doi.org/10.1097/QAD.0b013e328326cc0d>
- Siliciano, J. D., Kajdas, J., Finzi, D., Quinn, T. C., Chadwick, K., Margolick, J. B., Kovacs, C., Gange, S. J., & 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(6), 727-728. <https://doi.org/10.1038/nm880>
- Siliciano, J. D., & Siliciano, R. F. (2021). In Vivo Dynamics of the Latent Reservoir for HIV-1: New Insights and Implications for Cure. *Annu Rev Pathol*. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-050520-112001>
- Simonetti, F. R., White, J. A., Tumiotto, C., Ritter, K. D., Cai, M., Gandhi, R. T., Deeks, S. G., Howell, B. J., Montaner, L. J., Blankson, J. N., Martin, A., Laird, G. M., Siliciano, R. F., Mellors, J. W., & Siliciano, J. D. (2020). Intact proviral DNA assay analysis of large cohorts of people with HIV provides a benchmark for the frequency and composition of persistent proviral DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 117(31), 18692-18700. <https://doi.org/10.1073/pnas.2006816117>
- Simonetti, F. R., Zhang, H., Soroosh, G. P., Duan, J., Rhodehouse, K., Hill, A. L., Beg, S. A., McCormick, K., Raymond, H. E., Nobles, C. L., Everett, J. K., Kwon, K. J., White, J. A., Lai, J.,

- Margolick, J. B., Hoh, R., Deeks, S. G., Bushman, F. D., Siliciano, J. D., & Siliciano, R. F. (2021). Antigen-driven clonal selection shapes the persistence of HIV-1-infected CD4+ T cells in vivo. *J Clin Invest*, *131*(3). <https://doi.org/10.1172/JCI145254>
- Smith, D. K., Grohskopf, L. A., Black, R. J., Auerbach, J. D., Veronese, F., Struble, K. A., Cheever, L., Johnson, M., Paxton, L. A., Onorato, I. M., & Greenberg, A. E. (2005). Antiretroviral postexposure prophylaxis after sexual, injection-drug use, or other nonoccupational exposure to HIV in the United States: recommendations from the U.S. Department of Health and Human Services. *MMWR Recomm Rep*, *54*(Rr-2), 1-20.
- Sneller, M. C., Blazkova, J., Justement, J. S., Shi, V., Kennedy, B. D., Gittens, K., Tolstenko, J., McCormack, G., Whitehead, E. J., Schneck, R. F., Proschan, M. A., Benko, E., Kovacs, C., Oguz, C., Seaman, M. S., Caskey, M., Nussenzweig, M. C., Fauci, A. S., Moir, S., & Chun, T. W. (2022). Combination anti-HIV antibodies provide sustained virological suppression. *Nature*, *606*(7913), 375-381. <https://doi.org/10.1038/s41586-022-04797-9>
- Sodroski, J., Goh, W. C., Rosen, C., Dayton, A., Terwilliger, E., & Haseltine, W. (1986). A second post-transcriptional trans-activator gene required for HTLV-III replication. *Nature*, *321*(6068), 412-417. <https://doi.org/10.1038/321412a0>
- 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., Koelsch, K. K., Pantaleo, G., Krosgaard, K., Sommerfelt, M., Fromentin, R., Chomont, N., Rasmussen, T. A., Ostergaard, L., & Tolstrup, M. (2015). The Depsipeptide Romidepsin Reverses HIV-1 Latency In Vivo. *PLoS Pathog*, *11*(9), e1005142. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005142>
- Song, R., Kafaie, J., & Laughrea, M. (2008). Role of the 5' TAR Stem-Loop and the U5-AUG Duplex in Dimerization of HIV-1 Genomic RNA. *Biochemistry*, *47*(10), 3283-3293. <https://doi.org/10.1021/bi7023173>
- Sony. (2019). *Sony Announces Launch of ID7000™ Flagship Spectral Cell Analyzer, Streamlined Multicolor Cell Analysis with more than 44 Colors*. Sony Corporation. Retrieved 2023-01-05 from <https://www.sony.com/en/SonyInfo/News/Press/201906/19-056E/>
- Soudeyns, H., Yao, X. I., Gao, Q., Belleau, B., Kraus, J. L., Nguyen-Ba, N., Spira, B., & Wainberg, M. A. (1991). Anti-human immunodeficiency virus type 1 activity and in vitro toxicity of 2'-deoxy-3'-thiacytidine (BCH-189), a novel heterocyclic nucleoside analog. *Antimicrob Agents Chemother*, *35*(7), 1386-1390. <https://doi.org/10.1128/AAC.35.7.1386>
- Stoeckius, M., Hafemeister, C., Stephenson, W., Houck-Loomis, B., Chattopadhyay, P. K., Swerdlow, H., Satija, R., & Smibert, P. (2017). Simultaneous epitope and transcriptome

- measurement in single cells. *Nat Methods*, 14(9), 865-868. <https://doi.org/10.1038/nmeth.4380>
- Stohr, W., Fidler, S., McClure, M., Weber, J., Cooper, D., Ramjee, G., Kaleebu, P., Tambussi, G., Schechter, M., Babiker, A., Phillips, R. E., Porter, K., & Frater, J. (2013). Duration of HIV-1 viral suppression on cessation of antiretroviral therapy in primary infection correlates with time on therapy. *PLoS One*, 8(10), e78287. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0078287>
- Stone, M., Rosenbloom, D. I. S., Bacchetti, P., Deng, X., Dimapasoc, M., Keating, S., Bakkour, S., Richman, D. D., Mellors, J. W., Deeks, S. G., Lai, J., Beg, S., Siliciano, J. D., Pagliuzza, A., Chomont, N., Lackman-Smith, C., Ptak, R. G., & Busch, M. P. (2021). Assessing the Suitability of Next-Generation Viral Outgrowth Assays to Measure Human Immunodeficiency Virus 1 Latent Reservoir Size. *J Infect Dis*, 224(7), 1209-1218. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiaa089>
- Strain, M. C., Lada, S. M., Luong, T., Rought, S. E., Gianella, S., Terry, V. H., Spina, C. A., Woelk, C. H., & Richman, D. D. (2013). Highly Precise Measurement of HIV DNA by Droplet Digital PCR. *PLoS One*, 8(4), e55943. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0055943>
- Sun, W., Gao, C., Hartana, C. A., Osborn, M. R., Einkauf, K. B., Lian, X., Bone, B., Bonheur, N., Chun, T. W., Rosenberg, E. S., Walker, B. D., Yu, X. G., & Lichterfeld, M. (2023). Phenotypic signatures of immune selection in HIV-1 reservoir cells. *Nature*, 614(7947), 309-317. <https://doi.org/10.1038/s41586-022-05538-8>
- Tang, F., Barbacioru, C., Wang, Y., Nordman, E., Lee, C., Xu, N., Wang, X., Bodeau, J., Tuch, B. B., Siddiqui, A., Lao, K., & Surani, M. A. (2009). mRNA-Seq whole-transcriptome analysis of a single cell. *Nat Methods*, 6(5), 377-382. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1315>
- Teixido, J., Martinez-Moreno, M., Diaz-Martinez, M., & Sevilla-Movilla, S. (2018). The good and bad faces of the CXCR4 chemokine receptor. *Int J Biochem Cell Biol*, 95, 121-131. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2017.12.018>
- Therrien, R., & Lemire, B. (2022). *Tableau synthèse des antirétroviraux, 2022-2023*. Guide Thérapeutique VIH/VHC. Retrieved 2023-02-10 from https://www.guidetherapeutiquevih.com/outils-professionnels/tableau-synthese-des-antiretroviraux/?utm_source=All&utm_campaign=Info+VIH+-+Décembre+2017&utm_medium=email
- Tindall, B., Barker, S., Donovan, B., Barnes, T., Roberts, J., Kronenberg, C., Gold, J., Penny, R., & Cooper, D. (1988). Characterization of the acute clinical illness associated with human immunodeficiency virus infection. *Arch Intern Med*, 148(4), 945-949. <https://doi.org/10.1001/archinte.1988.00380040185026>

- Trautmann, L., Janbazian, L., Chomont, N., Said, E. A., Gimmig, S., Bessette, B., Boulassel, M. R., Delwart, E., Sepulveda, H., Balderas, R. S., Routy, J. P., Haddad, E. K., & Sekaly, R. P. (2006). Upregulation of PD-1 expression on HIV-specific CD8+ T cells leads to reversible immune dysfunction. *Nat Med*, 12(10), 1198-1202. <https://doi.org/10.1038/nm1482>
- Tsai, A., Irrinki, A., Kaur, J., Cihlar, T., Kukulj, G., Sloan, D. D., & Murry, J. P. (2017). Toll-Like Receptor 7 Agonist GS-9620 Induces HIV Expression and HIV-Specific Immunity in Cells from HIV-Infected Individuals on Suppressive Antiretroviral Therapy. *J Virol*, 91(8). <https://doi.org/10.1128/JVI.02166-16>
- Turk, G., Seiger, K., Lian, X., Sun, W., Parsons, E. M., Gao, C., Rassadkina, Y., Polo, M. L., Czernikier, A., Ghiglione, Y., Vellicce, A., Varriale, J., Lai, J., Yuki, Y., Martin, M., Rhodes, A., Lewin, S. R., Walker, B. D., Carrington, M., . . . Yu, X. G. (2021). A Possible Sterilizing Cure of HIV-1 Infection Without Stem Cell Transplantation. *Ann Intern Med*. <https://doi.org/10.7326/L21-0297>
- Tzu, S. (2018). *L'art de la guerre* (J. Lévi, Trans.; Fayard/Pluriel, Ed. Pluriel ed.).
- Vabret, A., & Miszczak, F. (2010). Changement de tropisme des coronavirus. *Revue Francophone des Laboratoires*, 2010(423), 63-68. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1773-035X\(10\)70561-X](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1773-035X(10)70561-X)
- Valcour, V. G., Ananworanich, J., Aagsalda, M., Sailasuta, N., Chalermchai, T., Schuetz, A., Shikuma, C., Liang, C. Y., Jirajariyavej, S., Sithinamsuwan, P., Tipsuk, S., Clifford, D. B., Paul, R., Fletcher, J. L., Marovich, M. A., Slike, B. M., DeGruttola, V., Shiramizu, B., & Team, S. P. (2013). HIV DNA reservoir increases risk for cognitive disorders in cART-naive patients. *PLoS One*, 8(7), e70164. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0070164>
- Valdebenito, S., Castellano, P., Ajasin, D., & Eugenin, E. A. (2021). Astrocytes are HIV reservoirs in the brain: A cell type with poor HIV infectivity and replication but efficient cell-to-cell viral transfer. *J Neurochem*, 158(2), 429-443. <https://doi.org/10.1111/jnc.15336>
- Van Lint, C., Amella, C. A., Emiliani, S., John, M., Jie, T., & Verdin, E. (1997). Transcription factor binding sites downstream of the human immunodeficiency virus type 1 transcription start site are important for virus infectivity. *J Virol*, 71(8), 6113-6127. <https://doi.org/10.1128/JVI.71.8.6113-6127.1997>
- Van Lint, C., Emiliani, S., Ott, M., & Verdin, E. (1996). Transcriptional activation and chromatin remodeling of the HIV-1 promoter in response to histone acetylation. *EMBO J*, 15(5), 1112-1120. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8605881>

- Vandergeeten, C., Fromentin, R., DaFonseca, S., Lawani, M. B., Sereti, I., Lederman, M. M., Ramgopal, M., Routy, J. P., Sekaly, R. P., & Chomont, N. (2013). Interleukin-7 promotes HIV persistence during antiretroviral therapy. *Blood*, *121*(21), 4321-4329. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-11-465625>
- Velu, V., Titanji, K., Ahmed, H., Shetty, R. D., Chennareddi, L. S., Freeman, G. J., Ahmed, R., & Amara, R. R. (2022). PD-1 blockade following ART interruption enhances control of pathogenic SIV in rhesus macaques. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *119*(33), e2202148119. <https://doi.org/10.1073/pnas.2202148119>
- Verdin, E., Paras, P., Jr., & Van Lint, C. (1993). Chromatin disruption in the promoter of human immunodeficiency virus type 1 during transcriptional activation. *EMBO J*, *12*(8), 3249-3259. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8344262>
- Vibholm, L., Schleimann, M. H., Hojen, J. F., Benfield, T., Offersen, R., Rasmussen, K., Olesen, R., Dige, A., Agnholt, J., Grau, J., Buzon, M., Wittig, B., Lichterfeld, M., Petersen, A. M., Deng, X., Abdel-Mohsen, M., Pillai, S. K., Rutsaert, S., Trypsteen, W., . . . Sogaard, O. S. (2017). Short-Course Toll-Like Receptor 9 Agonist Treatment Impacts Innate Immunity and Plasma Viremia in Individuals With Human Immunodeficiency Virus Infection. *Clin Infect Dis*, *64*(12), 1686-1695. <https://doi.org/10.1093/cid/cix201>
- Vibholm, L. K., Konrad, C. V., Schleimann, M. H., Frattari, G., Winckelmann, A., Klastrup, V., Jensen, N. M., Jensen, S. S., Schmidt, M., Wittig, B., Zuwala, K., Mack, K., Olesen, R., Hua, S., Lichterfeld, M., Ostergaard, L., Denton, P. W., Tolstrup, M., & Sogaard, O. S. (2019). Effects of 24-week Toll-like receptor 9 agonist treatment in HIV type 1+ individuals. *AIDS*, *33*(8), 1315-1325. <https://doi.org/10.1097/QAD.0000000000002213>
- Vidya Vijayan, K. K., Karthigeyan, K. P., Tripathi, S. P., & Hanna, L. E. (2017). Pathophysiology of CD4+ T-Cell Depletion in HIV-1 and HIV-2 Infections. *Front Immunol*, *8*, 580. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00580>
- Viruses, I. C. o. T. o. (2022). *Taxon Details - Species: Human immunodeficiency virus 1*. International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). Retrieved September 28 from https://ictv.global/taxonomy/taxondetails?taxon_id=202105030
- von Stockenstrom, S., Odevall, L., Lee, E., Sinclair, E., Bacchetti, P., Killian, M., Epling, L., Shao, W., Hoh, R., Ho, T., Faria, N. R., Lemey, P., Albert, J., Hunt, P., Loeb, L., Pilcher, C., Poole, L., Hatano, H., Somsouk, M., . . . Palmer, S. (2015). Longitudinal Genetic Characterization Reveals That Cell Proliferation Maintains a Persistent HIV Type 1 DNA Pool During Effective HIV Therapy. *J Infect Dis*, *212*(4), 596-607. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiv092>

- Wagner, T. A., McLaughlin, S., Garg, K., Cheung, C. Y., Larsen, B. B., Styrchak, S., Huang, H. C., Edlefsen, P. T., Mullins, J. I., & Frenkel, L. M. (2014). HIV latency. Proliferation of cells with HIV integrated into cancer genes contributes to persistent infection. *Science*, *345*(6196), 570-573. <https://doi.org/10.1126/science.1256304>
- Wan, Z., & Chen, X. (2014). Triptolide inhibits human immunodeficiency virus type 1 replication by promoting proteasomal degradation of Tat protein. *Retrovirology*, *11*, 88. <https://doi.org/10.1186/s12977-014-0088-6>
- Wang, C., Schlub, T. E., Yu, W. H., Tan, C. S., Stefic, K., Gianella, S., Smith, D. M., Lauffenburger, D. A., Chaillon, A., & Julg, B. (2022). Landscape of Human Immunodeficiency Virus Neutralization Susceptibilities Across Tissue Reservoirs. *Clin Infect Dis*, *75*(8), 1342-1350. <https://doi.org/10.1093/cid/ciac164>
- Wang, G., Zhao, N., Berkhout, B., & Das, A. T. (2018). CRISPR-Cas based antiviral strategies against HIV-1. *Virus Res*, *244*, 321-332. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2017.07.020>
- Wang, Z., Gurule, E. E., Brennan, T. P., Gerold, J. M., Kwon, K. J., Hosmane, N. N., Kumar, M. R., Beg, S. A., Capoferri, A. A., Ray, S. C., Ho, Y. C., Hill, A. L., Siliciano, J. D., & Siliciano, R. F. (2018). Expanded cellular clones carrying replication-competent HIV-1 persist, wax, and wane. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *115*(11), E2575-E2584. <https://doi.org/10.1073/pnas.1720665115>
- Webb, G. M., Molden, J., Busman-Sahay, K., Abdulhaqq, S., Wu, H. L., Weber, W. C., Bateman, K. B., Reed, J. S., Northrup, M., Maier, N., Tanaka, S., Gao, L., Davey, B., Carpenter, B. L., Axthelm, M. K., Stanton, J. J., Smedley, J., Greene, J. M., Safrit, J. T., . . . Sacha, J. B. (2020). The human IL-15 superagonist N-803 promotes migration of virus-specific CD8+ T and NK cells to B cell follicles but does not reverse latency in ART-suppressed, SHIV-infected macaques. *PLoS Pathog*, *16*(3), e1008339. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008339>
- Wedrychowski, A., Martin, H. A., Li, Y., Telwatte, S., Kadiyala, G. N., Melberg, M., Etemad, B., Connick, E., Jacobson, J. M., Margolis, D. M., Skiest, D., Volberding, P., Hecht, F., Deeks, S., Wong, J. K., Li, J. Z., & Yukl, S. A. (2023). Transcriptomic Signatures of Human Immunodeficiency Virus Post-Treatment Control. *J Virol*, *97*(1), e0125422. <https://doi.org/10.1128/jvi.01254-22>
- Wei, X., Decker, J. M., Wang, S., Hui, H., Kappes, J. C., Wu, X., Salazar-Gonzalez, J. F., Salazar, M. G., Kilby, J. M., Saag, M. S., Komarova, N. L., Nowak, M. A., Hahn, B. H., Kwong, P. D., & Shaw, G. M. (2003). Antibody neutralization and escape by HIV-1. *Nature*, *422*(6929), 307-312. <https://doi.org/10.1038/nature01470>

- Wei, X., Ghosh, S. K., Taylor, M. E., Johnson, V. A., Emini, E. A., Deutsch, P., Lifson, J. D., Bonhoeffer, S., Nowak, M. A., Hahn, B. H., & et al. (1995). Viral dynamics in human immunodeficiency virus type 1 infection. *Nature*, 373(6510), 117-122. <https://doi.org/10.1038/373117a0>
- Weymar, G. H. J., Bar-On, Y., Oliveira, T. Y., Gaebler, C., Ramos, V., Hartweg, H., Breton, G., Caskey, M., Cohn, L. B., Jankovic, M., & Nussenzweig, M. C. (2022). Distinct gene expression by expanded clones of quiescent memory CD4(+) T cells harboring intact latent HIV-1 proviruses. *Cell Rep*, 40(10), 111311. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2022.111311>
- Wherry, E. J. (2011). T cell exhaustion. *Nat Immunol*, 12(6), 492-499. <https://doi.org/10.1038/ni.2035>
- Wherry, E. J., Blattman, J. N., Murali-Krishna, K., van der Most, R., & Ahmed, R. (2003). Viral persistence alters CD8 T-cell immunodominance and tissue distribution and results in distinct stages of functional impairment. *J Virol*, 77(8), 4911-4927. <https://doi.org/10.1128/jvi.77.8.4911-4927.2003>
- White, J. A., Kufera, J. T., Bachmann, N., Dai, W., Simonetti, F. R., Armstrong, C., Lai, J., Beg, S., Siliciano, J. D., & Siliciano, R. F. (2022). Measuring the latent reservoir for HIV-1: Quantification bias in near full-length genome sequencing methods. *PLoS Pathog*, 18(9), e1010845. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1010845>
- White, J. A., Wu, F., Yasin, S., Moskovljevic, M., Varriale, J., Dragoni, F., Camilo Contreras, A., Duan, J., Zheng, M. Y., Tadzong, N. F., Patel, H. B., Quiambao, J. M. C., Rhodehouse, K., Zhang, H., Lai, J., Beg, S. A., Delannoy, M., Kilcrease, C., Hoffmann, C. J., . . . Simonetti, F. R. (2023). Clonally expanded HIV-1 proviruses with 5'-Leader defects can give rise to nonsuppressible residual viremia. *J Clin Invest*. <https://doi.org/10.1172/JCI165245>
- Whitney, J. B., Hill, A. L., Sanisetty, S., Penaloza-MacMaster, P., Liu, J., Shetty, M., Parenteau, L., Cabral, C., Shields, J., Blackmore, S., Smith, J. Y., Brinkman, A. L., Peter, L. E., Mathew, S. I., Smith, K. M., Borducchi, E. N., Rosenbloom, D. I., Lewis, M. G., Hattersley, J., . . . Barouch, D. H. (2014). Rapid seeding of the viral reservoir prior to SIV viraemia in rhesus monkeys. *Nature*, 512(7512), 74-77. <https://doi.org/10.1038/nature13594>
- Wiegand, A., Spindler, J., Hong, F. F., Shao, W., Cyktor, J. C., Cillo, A. R., Halvas, E. K., Coffin, J. M., Mellors, J. W., & Kearney, M. F. (2017). Single-cell analysis of HIV-1 transcriptional activity reveals expression of proviruses in expanded clones during ART. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 114(18), E3659-E3668. <https://doi.org/10.1073/pnas.1617961114>
- Wilk, E., Witte, T., Marquardt, N., Horvath, T., Kalippke, K., Scholz, K., Wilke, N., Schmidt, R. E., & Jacobs, R. (2009). Depletion of functionally active CD20+ T cells by rituximab treatment. *Arthritis Rheum*, 60(12), 3563-3571. <https://doi.org/10.1002/art.24998>

- Willey, R. L., Maldarelli, F., Martin, M. A., & Strebel, K. (1992). Human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein induces rapid degradation of CD4. *J Virol*, *66*(12), 7193-7200. <https://doi.org/10.1128/JVI.66.12.7193-7200.1992>
- Williams, W. B., Wiehe, K., Saunders, K. O., & Haynes, B. F. (2021). Strategies for induction of HIV-1 envelope-reactive broadly neutralizing antibodies. *J Int AIDS Soc*, *24 Suppl 7*, e25831. <https://doi.org/10.1002/jia2.25831>
- Winckelmann, A. A., Munk-Petersen, L. V., Rasmussen, T. A., Melchjorsen, J., Hjelholt, T. J., Montefiori, D., Ostergaard, L., Sogaard, O. S., & Tolstrup, M. (2013). Administration of a Toll-like receptor 9 agonist decreases the proviral reservoir in virologically suppressed HIV-infected patients. *PLoS One*, *8*(4), e62074. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0062074>
- Wong, J. K., Hezareh, M., Gunthard, H. F., Havlir, D. V., Ignacio, C. C., Spina, C. A., & Richman, D. D. (1997). Recovery of replication-competent HIV despite prolonged suppression of plasma viremia. *Science*, *278*(5341), 1291-1295. <https://doi.org/10.1126/science.278.5341.1291>
- Woodside, D. G., & Vanderslice, P. (2019). Chapter 3 - Inflammation and Regulation by Integrin Cell Adhesion Antagonists. In J. K. Actor & K. C. Smith (Eds.), *Translational Inflammation* (pp. 43-68). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813832-8.00003-0>
- Wu, V. H., Nobles, C. L., Kuri-Cervantes, L., McCormick, K., Everett, J. K., Nguyen, S., Del Rio Estrada, P. M., Gonzalez-Navarro, M., Torres-Ruiz, F., Avila-Rios, S., Reyes-Teran, G., Bushman, F. D., & Betts, M. R. (2020). Assessment of HIV-1 integration in tissues and subsets across infection stages. *JCI Insight*, *5*(20). <https://doi.org/10.1172/jci.insight.139783>
- Wu, V. H., Nordin, J. M. L., Nguyen, S., Joy, J., Mampe, F., Del Rio Estrada, P. M., Torres-Ruiz, F., Gonzalez-Navarro, M., Luna-Villalobos, Y. A., Avila-Rios, S., Reyes-Teran, G., Tebas, P., Montaner, L. J., Bar, K. J., Vella, L. A., & Betts, M. R. (2023). Profound phenotypic and epigenetic heterogeneity of the HIV-1-infected CD4(+) T cell reservoir. *Nat Immunol*, *24*(2), 359-370. <https://doi.org/10.1038/s41590-022-01371-3>
- Wu, X., Yang, Z. Y., Li, Y., Hogerkorp, C. M., Schief, W. R., Seaman, M. S., Zhou, T., Schmidt, S. D., Wu, L., Xu, L., Longo, N. S., McKee, K., O'Dell, S., Louder, M. K., Wycuff, D. L., Feng, Y., Nason, M., Doria-Rose, N., Connors, M., . . . Mascola, J. R. (2010). Rational design of envelope identifies broadly neutralizing human monoclonal antibodies to HIV-1. *Science*, *329*(5993), 856-861. <https://doi.org/10.1126/science.1187659>

- Wyl, V., Gianella, S., Fischer, M., Niederoest, B., Kuster, H., Battegay, M., Bernasconi, E., Cavassini, M., Rauch, A., Hirschel, B., Vernazza, P., Weber, R., Joos, B., Gunthard, H. F., & Swiss, H. I. V. C. S.-S. (2011). Early antiretroviral therapy during primary HIV-1 infection results in a transient reduction of the viral setpoint upon treatment interruption. *PLoS One*, *6*(11), e27463. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0027463>
- Yarchoan, R., & Uldrick, T. S. (2018). HIV-Associated Cancers and Related Diseases. *N Engl J Med*, *378*(11), 1029-1041. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1615896>
- Yednock, T. A., Cannon, C., Fritz, L. C., Sanchez-Madrid, F., Steinman, L., & Karin, N. (1992). Prevention of experimental autoimmune encephalomyelitis by antibodies against $\alpha 4\beta 1$ integrin. *Nature*, *356*(6364), 63-66. <https://doi.org/10.1038/356063a0>
- Yousry, T. A., Major, E. O., Ryschkewitsch, C., Fahle, G., Fischer, S., Hou, J., Curfman, B., Miskiel, K., Mueller-Lenke, N., Sanchez, E., Barkhof, F., Radue, E. W., Jager, H. R., & Clifford, D. B. (2006). Evaluation of patients treated with natalizumab for progressive multifocal leukoencephalopathy. *N Engl J Med*, *354*(9), 924-933. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa054693>
- Yukl, S. A., Gianella, S., Sinclair, E., Epling, L., Li, Q., Duan, L., Choi, A. L., Girling, V., Ho, T., Li, P., Fujimoto, K., Lampiris, H., Hare, C. B., Pandori, M., Haase, A. T., Gunthard, H. F., Fischer, M., Shergill, A. K., McQuaid, K., . . . Wong, J. K. (2010). Differences in HIV burden and immune activation within the gut of HIV-positive patients receiving suppressive antiretroviral therapy. *J Infect Dis*, *202*(10), 1553-1561. <https://doi.org/10.1086/656722>
- Yukl, S. A., Kaiser, P., Kim, P., Telwatte, S., Joshi, S. K., Vu, M., Lampiris, H., & 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*(430). <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aap9927>
- Yukl, S. A., Sinclair, E., Somsouk, M., Hunt, P. W., Epling, L., Killian, M., Girling, V., Li, P., Havlir, D. V., Deeks, S. G., Wong, J. K., & Hatano, H. (2014). A comparison of methods for measuring rectal HIV levels suggests that HIV DNA resides in cells other than CD4+ T cells, including myeloid cells. *AIDS*, *28*(3), 439-442. <https://doi.org/10.1097/QAD.000000000000166>
- Yurkovetskiy, L., Guney, M. H., Kim, K., Goh, S. L., McCauley, S., Dauphin, A., Diehl, W. E., & Luban, J. (2018). Primate immunodeficiency virus proteins Vpx and Vpr counteract transcriptional repression of proviruses by the HUSH complex. *Nat Microbiol*, *3*(12), 1354-1361. <https://doi.org/10.1038/s41564-018-0256-x>
- Zaikos, T. D., Terry, V. H., Sebastian Kettinger, N. T., Lubow, J., Painter, M. M., Virgilio, M. C., Neevel, A., Taschuk, F., Onafuwa-Nuga, A., McNamara, L. A., Riddell, J. t., Bixby, D.,

- Markowitz, N., & Collins, K. L. (2018). Hematopoietic Stem and Progenitor Cells Are a Distinct HIV Reservoir that Contributes to Persistent Viremia in Suppressed Patients. *Cell Rep*, 25(13), 3759-3773 e3759. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.11.104>
- Zalar, A., Figueroa, M. I., Ruibal-Ares, B., Baré, P., Cahn, P., de Bracco, M. M. d. E., & Belmonte, L. (2010). Macrophage HIV-1 infection in duodenal tissue of patients on long term HAART. *Antiviral Research*, 87(2), 269-271. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2010.05.005>
- Zaongo, S. D., Harypursat, V., & Chen, Y. (2022). Single-Cell Sequencing Facilitates Elucidation of HIV Immunopathogenesis: A Review of Current Literature. *Front Immunol*, 13, 828860. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.828860>
- Zhang, J., & Crumpacker, C. (2022). HIV UTR, LTR, and Epigenetic Immunity. *Viruses*, 14(5). <https://doi.org/10.3390/v14051084>
- Zhang, L., Ramratnam, B., Tenner-Racz, K., He, Y., Vesanen, M., Lewin, S., Talal, A., Racz, P., Perelson, A. S., Korber, B. T., Markowitz, M., & Ho, D. D. (1999). Quantifying residual HIV-1 replication in patients receiving combination antiretroviral therapy. *N Engl J Med*, 340(21), 1605-1613. <https://doi.org/10.1056/nejm199905273402101>
- Zhou, Q., Chen, D., Pierstorff, E., & Luo, K. (1998). Transcription elongation factor P-TEFb mediates Tat activation of HIV-1 transcription at multiple stages. *The EMBO Journal*, 17(13), 3681-3691. <https://doi.org/https://doi.org/10.1093/emboj/17.13.3681>
- Zhu, Y., Pe'ery, T., Peng, J., Ramanathan, Y., Marshall, N., Marshall, T., Amendt, B., Mathews, M. B., & Price, D. H. (1997). Transcription elongation factor P-TEFb is required for HIV-1 tat transactivation in vitro. *Genes Dev*, 11(20), 2622-2632. <https://doi.org/10.1101/gad.11.20.2622>
- Zila, V., Margiotta, E., Turonova, B., Muller, T. G., Zimmerli, C. E., Mattei, S., Allegretti, M., Borner, K., Rada, J., Muller, B., Lusic, M., Krausslich, H. G., & Beck, M. (2021). Cone-shaped HIV-1 capsids are transported through intact nuclear pores. *Cell*, 184(4), 1032-1046 e1018. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.01.025>

Annexes

The multifaceted nature of HIV latency

Caroline Dufour^{1#}, Pierre Gantner^{1#}, Rémi Fromentin², Nicolas Chomont^{1,2*}

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

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

Equal contributions

* Corresponding author:

Nicolas Chomont

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

Tel: +1 514-890-8000 #31266

E-mail: nicolas.chomont@umontreal.ca

Abstract

Although antiretroviral therapies (ARTs) potently inhibit HIV replication, they do not eradicate the virus. HIV persists in cellular and anatomical reservoirs that show minimal decay during ART. A large number of studies conducted during the past 20 years have shown that HIV persists in a small pool of cells harboring integrated and replication-competent viral genomes. The majority of these cells do not produce viral particles and constitute what is referred to as the latent reservoir of HIV infection. Therefore, although HIV is not considered as a typical latent virus, it can establish a state of nonproductive infection under rare circumstances, particularly in memory CD4⁺ T cells, which represent the main barrier to HIV eradication. While it was originally thought that the pool of latently infected cells was largely composed of cells harboring transcriptionally silent genomes, recent evidence indicates that several blocks contribute to the nonproductive state of these cells. Here, we describe the virological and immunological factors that play a role in the establishment and persistence of the pool of latently infected cells and review the current approaches aimed at eliminating the latent HIV reservoir.

Distinguishing HIV latency and HIV persistence

More than 20 years after the discovery of combination antiretroviral therapy (ART), complete eradication of HIV infection has not yet been achieved, with the notable exception of a few rare cases (1, 2). While ART blocks new cycle of viral replication and partially restores immune functions, it is not a cure. In the vast majority of people living with HIV (PLHIV), interrupting ART leads to rapid viral load rebound, usually within a few weeks after treatment cessation (3), even if treatment was initiated during the first weeks of infection and maintained for years (4). These clinical observations indicate that HIV persists in reservoirs that are largely insensitive to antiretroviral drugs. Viral reservoirs have been defined as cell types or anatomical sites in association with which replication-competent forms of the virus persist with more stable kinetic properties than in the main pool of actively replicating virus (5, 6). This definition implies that any infected cell with a half-life of more than 2 days, which corresponds to the average half-life of productively infected cells (7, 8), may represent a reservoir for HIV. Using ultrasensitive methods to quantify and characterize traces of virus persisting in PLHIV and receiving fully effective ART, two types of viral reservoirs that could both contribute to HIV persistence have been identified (Figure 1).

A first reservoir is thought to be maintained by residual viral replication during ART, which has been attributed to the suboptimal diffusion of antiretroviral drugs in lymphoid tissues (9), allowing the virus to replicate at low levels. Whether this phenomenon occurs in the majority of individuals on ART is still controversial (10). Ongoing viral replication during ART is supported by a few studies that have demonstrated viral evolution in virally suppressed individuals (11) and perturbation in the reservoir following treatment intensification (12, 13), suggesting that ART is not fully efficient. The fact that HIV-specific CD8⁺ T cells may not be able to access anatomical sites in which ongoing replication occurs, for example in the germinal center of second lymphoid organs (14, 15) or in immune-privileged organs such as testis (16), may also contribute to residual levels of viral replication during ART. In addition, HIV-specific cytotoxic T lymphocytes have limited killing capacity (17, 18), possibly due to their persistent exhaustion status (19) and/or to immunosuppressive environments (20), which may permit the replenishment of the HIV reservoir.

While residual levels of viral replication may occur in a fraction of individuals on ART, particularly those who received less efficient antiviral drugs and whose immune functions were not restored by ART, multiple studies failed to identify strong evidence for ongoing viral replication in individuals receiving new-generation antiviral drugs (21–24). Although the replenishment of the HIV reservoir through de novo infection during ART cannot be excluded, its demonstration is difficult, and the recent data indicating that the bulk of the reservoir is established near the time of ART initiation argue against it (25).

The second type of viral reservoir that contributes to HIV persistence is a small pool of latently infected cells that persists for decades in PLHIV receiving ART (26–28). Latently infected cells can be defined as cells harboring integrated and intact proviruses that do not actively produce infectious virions, but that have the capacity to do so upon stimulation (5). Even though HIV can establish latency, it differs from herpesviruses, which produce viral proteins that are specifically required for the establishment and maintenance of a viral latency program. The capacity of HIV to lie dormant within specific types of cells and at extremely low frequencies suggests that it can establish latency under rare circumstances. The first evidence that HIV can establish a nonproductive state of infection in CD4+ T cells was demonstrated in 1995, before the implementation of combined ART in PLHIV: Chun et al. isolated resting CD4+ T cells from the blood of individuals with active HIV infection and observed that a small fraction of these cells harbored integrated HIV genomes and could produce viral particles upon stimulation *ex vivo* (29). The fraction of resting CD4+ T cells with integrated provirus is similarly low in blood and lymph nodes and much lower than the frequency of cells harboring unintegrated viral genomes, which are much shorter-lived (30) but can complicate the measurement of the HIV reservoir during untreated HIV infection. In 1997, the implementation of effective ART in PLHIV revealed the clinical importance of this pool of latently infected cells: three studies reported the presence of a small number of persistently infected cells harboring replication-competent HIV in individuals on suppressive ART (26–28). Although these cells are extremely rare (around 1 in 1 million resting CD4+ T cells), the reservoir is long-lived, with an estimated half-life of 44 months (31, 32), indicating that ART alone will not eradicate the pool of latently infected cells in a lifetime.

Although it was rapidly apparent that this small pool of persistently infected cells would represent a formidable challenge to HIV eradication, more than 20 years later, the precise nature of the HIV reservoir remains unclear. In addition to the diversity in the tissues and cellular subsets in which HIV persists during ART (discussed below), a variety of nonproductive infection states have been described. The assessment of the transcriptional and translational status of persistent HIV proviruses in virally suppressed individuals challenges our definition of HIV latency. Whereas viral latency is often associated with transcriptional latency (i.e., the lack of transcription from the HIV promoter), an increasing number of studies indicate that complete silencing of the HIV promoter is a rare event (33, 34). Therefore, a relatively large fraction and possibly the majority of latently infected cells (as defined by cells that do not produce viral particles) may express low levels of short viral transcripts (34, 35). Although these abortive transcripts are frequently produced, they rarely elongate enough to generate complete or spliced transcripts (36). Accordingly, production of viral proteins by latently infected cells appears to be rare (37, 38). This suggests that several blocks may contribute to the inability of persistently infected cells to produce infectious viral particles, including blocks in elongation of transcription (36), nuclear export (39), multiple splicing (34), and translation, as detailed below.

Even if the majority of persistently infected cells do not produce viral particles spontaneously, low levels of viremia, below the limit of detection of commercial assays, can be measured in the majority of PLHIV on ART (40, 41). The presence of residual viremia indicates that a small fraction of persistently infected cells produces viral particles at a given time. As mentioned above, residual viremia is unlikely to originate from low levels of residual replication, but rather from the production of viral particles from a stable pool of persistently infected cells. Indeed, the small population of viral particles circulating in individuals on ART is dominated by a predominant plasma clone not found in the latent reservoir, indicating that these virions are unlikely to replenish the persistent reservoir (42, 43). Residual levels of viremia show a two-phase decay, suggesting that it may arise from at least two cell compartments, one in which viral production decays over time and a second in which viral production remains stable for at least 7 years (44). The source of residual viremia remains currently unknown. The existence of this “active reservoir”

is an additional challenge to the development of effective curative strategies, since it represents a likely cause of viral rebound upon ART interruption.

Although the HIV reservoir is usually defined as a pool of cells harboring replication-competent (and therefore intact) genomes, several lines of evidence indicate that defective proviruses, even if not capable of replication, have the ability to produce viral transcripts and viral proteins (45, 46). Albeit indirectly, these defective genomes likely contribute to sustained inflammation and T cell activation even after prolonged ART (47, 48), which may in turn contribute to HIV persistence by promoting the proliferation of infected T cells (49, 50).

Establishment of HIV latency

When, where, and how HIV latency is established is still the object of intensive investigations. In the absence of ART, activated CD4⁺ T cells represent the main target for HIV and die rapidly upon infection (7, 8). Only a minute fraction of these cells survives and enters the pool of persistent and long-lived latently infected cells (51). Although the timing of the establishment of the pool of latently infected cells in humans remains unclear, several groups recently used nonhuman primate models of HIV infection (rhesus macaques infected with SIV) to precisely determine the duration of untreated infection needed to establish persistent infection (52, 53). In these studies, ART was initiated at different times after infection, and the size of the pool of persistent SIV-infected cells during prolonged suppressive therapy was evaluated by measurement of markers of viral persistence and by analytical treatment interruption. Whitney et al. (52) reported that initiation of ART 3 days after SIV inoculation blocked the emergence of viral RNA and proviral DNA in peripheral blood. Nevertheless, after discontinuation of ART following 24 weeks of fully suppressive therapy, virus rebounded in all animals (with a moderate but statistically significant delay in comparison with animals initiating ART later). In contrast, Okoye et al. (53) observed that ART initiation at days 4 and 5 followed by suppressive therapy for 2 years led to viral control and possibly eradication of the virus, indicating that very early and prolonged therapy may either prevent the establishment or accelerate the clearance of viral

reservoirs. Altogether, these observations indicate that early ART may not entirely prevent the establishment of the reservoir, but may accelerate its decay.

For obvious reasons, human studies of early reservoir establishment are much more complicated to conduct: very recently infected individuals are difficult to identify, and access to tissues from PLHIV poses logistical and ethical challenges. The unique case of an individual infected during the initiation of pre-exposure prophylaxis who initiated ART only 10 days after infection is informative: even if HIV could not be detected in blood and tissues from this individual after 2 years of therapy, he experienced viral rebound 225 days after ART cessation, suggesting that a persistent reservoir was established in less than 10 days (54). In line with this observation, initiation of ART in eight individuals at the earliest stage of diagnosable HIV infection (Fiebig I stage) drastically reduced the size of the pool of HIV-infected cells but did not prevent viral rebound upon ART initiation (4, 55). A recent and larger study of acutely treated PLHIV revealed that the pool of infected cells rapidly increases and reaches its maximal size in tissues in the first 2 weeks of infection, i.e., before seroconversion (56). Interestingly, the majority of these early targets are rapidly cleared upon ART initiation, suggesting that infected cells have a greater ability to persist after peak viremia. This is in line with the study by Okoye et al. in nonhuman primates (53) and suggests that the early reservoir may be relatively labile. The virological and immunological mechanisms supporting this phenomenon remain to be determined.

As mentioned above, circulating cells are not the unique site of HIV replication and are unlikely to represent the most favorable environment for the establishment of HIV latency. Less than 2% of the total body T cells are found in peripheral blood. Therefore, it is not surprising that HIV-infected cells are found in multiple tissues after years of ART (57, 58), particularly in gut and lymph nodes, and at lower frequencies in the spleen, liver, lung, central nervous system, and bone marrow (59). Since gut-associated lymphoid tissue (GALT) and lymph nodes are particularly enriched in persistently infected cells during ART (56, 60), lymphoid tissues may represent a favorable environment for the establishment of viral latency.

The anatomical location and the timing of the emergence of persistently infected cells offer a glimpse into some of the mechanisms contributing to the establishment of HIV latency (Figure 2).

Latently infected cells are mainly resting memory CD4⁺ T cells (26–28, 30, 61). The transition from an activated state to quiescence may offer a narrow window of opportunity that permits HIV silencing and persistence of the infected cells. During the contraction phase of the immune response, when the antigen load decreases and activated cells transition from an effector to a memory phenotype, a rare subset of cells are still permissive to HIV infection but also are transcriptionally programmed to become quiescent, a state that is favorable to HIV latency (62). The role of cytokines such as TGF- β , IL-10, and IL-8 in this phenomenon has been confirmed in *in vitro* experiments using polarized CD4⁺ T cells (63). Additionally, immune checkpoint molecules are known to dampen T cell activation and may consequently favor HIV latency. PD-1, LAG-3, and TIGIT were initially identified as markers of HIV-infected cells during ART (64–66). Further investigations demonstrated the active role of PD-1 in silencing HIV transcription (67, 68). Interestingly, the presence of monocytes or myeloid dendritic cells (mDCs) in coculture with activated HIV-infected T cells may favor their transition to a postactivation state of latency, highlighting the role of cell-to-cell contact in the establishment of HIV latency (69, 70).

Several lines of evidence suggest that latency may also be directly established in resting CD4⁺ T cells. Although resting CD4⁺ T cells are refractory to productive infection as a result of numerous blocks in the HIV replication cycle, cell-cell interactions increase their susceptibility (71–73). Soluble factors are also known to increase the susceptibility of resting CD4⁺ T cells to latent HIV infection. For instance, IL-7, a cytokine involved in T cell homeostasis, modulates the activity of the restriction factor SAMHD1 and increases the permissiveness of resting CD4⁺ T cells to HIV infection (74, 75). Similarly, CCL19 and CCL20, two chemokines involved in the trafficking of cells to lymph nodes and GALT, enhance HIV infection of resting CD4⁺ T cells by modifying the actin cytoskeleton, thereby increasing nuclear entry and integration of the viral DNA (76). Furthermore, the anatomical localization of resting CD4⁺ T cells may influence their susceptibility to HIV infection: CD4⁺ T cells isolated from lymphoid tissues (spleen and tonsil), which display an intermediate level of activation, are more permissive to HIV infection and latency (77). A model in which cell-to-cell transmission from activated, productively infected CD4⁺ T cells to resting CD4⁺ T cell leads to latent infection may mimic the spread of HIV infection in anatomical sites with a high density of T cells, such as germinal centers in lymph nodes (78). All these studies

support an alternative model in which direct nonproductive infection of resting CD4+ T cells may result in viral latency.

Recent data also suggest that the strength of the T cell receptor engagement could influence the transcriptionally active versus latent status of the provirus. Intermediate and low signals predispose cells toward latent infections that are refractory to reversal (79). Evans et al. demonstrated that interactions between antigen-presenting cells (APCs) and resting CD4+ T cells favor latency establishment (80). Signals from mDCs induce downregulation of the NF- κ B pathways and upregulation of Krüppel-like factor 6 (KLF6) in CD4+ T cells, thereby promoting T cell quiescence. *In vitro*, only mDCs and CD14+ monocytes expressing specific cell surface molecules involved in cell-cell interaction have the ability to induce HIV latency in CD4+ T cells (69), suggesting that cell-cell interactions modify the transcription network of CD4+ T cells to establish a prolatency environment in a cell-specific manner.

Locations of HIV reservoirs

In addition to blood, persistently infected cells are found in the lymph nodes (64), gut (81–83), central nervous system (84), lungs (85), bone marrow (86, 87), and genital tract (16, 88–90). Recently, a study performed with tissues collected from six PLHIV postmortem revealed the presence of HIV DNA in all 28 tissues analyzed (58). If HIV DNA can be easily detected in most parts of the body at relatively high frequencies, these measures overestimate the size of the reservoir. In the blood, replication-competent proviruses are present in only 1 in 1 million CD4+ T cells (26, 27), whereas HIV DNA quantification typically measures frequencies that are two to three orders of magnitude higher. This difference is due to a large proportion of HIV genomes presenting various defects preventing them from replicating (91). In the blood, defective proviruses represent 95%–98% of the viral genomes (92), and these defects accumulate rapidly in the course of infection (93). Only a few studies have investigated the presence of intact or replication-competent genomes in tissues from PLHIV (30, 58, 64, 94). Therefore, the exact contribution of these anatomical reservoirs to the pool of persistently infected cells remains largely unknown.

It is generally accepted that memory CD4⁺ T cells represent the major cellular reservoir for HIV, at least quantitatively (30, 61). To a lesser extent, cellular reservoirs may also comprise myeloid cells such as monocytes, tissue-resident macrophages, and follicular dendritic cells (reviewed in refs. 95, 96), although whether these cells represent long-lived reservoirs for the virus after prolonged ART remains unclear (97–99). The CD4⁺ T cell compartment can be divided into subsets endowed with different functional, proliferative, and survival capacities. Several studies have shown that the less differentiated memory subsets, including stem cell memory (T_{scm}) and central memory (T_{cm}), are particularly enriched in HIV genomes during ART (61, 100, 101). These cells possess a high proliferation potential and, following antigen stimulation, can give rise to effector memory T (T_{em}) cells (102, 103). While T_{cm} cells have been shown to highly contribute to the pool of cells harboring integrated HIV DNA (61), the T_{em} subset may encompass the majority of intact and potentially replication-competent proviruses (104). In addition to these memory subsets, specific functionally polarized subsets of CD4⁺ T cells have also been shown to be enriched in persistent HIV: blood- and gut-derived Th17 cells are enriched in HIV proviruses (105), and a large portion of replication-competent viral genomes are found within the Th1 and T follicular helper cell (T_{fh}) subsets (64, 92). HIV also preferentially persists in tissue-resident memory T cells (106). The diversity of the cellular reservoirs for HIV, which are characterized by distinct mechanisms of maintenance, adds another level of complexity to the development of HIV eradication strategies (38, 107, 108).

Molecular mechanisms of HIV latency

Unlike herpesviruses, HIV does not encode for proteins specific for a latency program. Nonetheless, HIV expression is under the control of molecular components of the infected cell that can induce and/or maintain a nonproductive state of infection (Figure 3). A first mechanism that governs HIV expression is linked to the location of the integration site. HIV proviruses are more frequently integrated in introns of actively transcribed gene (109, 110). Integration in the same orientation of actively transcribed genes can impair HIV expression through transcriptional interference (111). HIV integration site may also influence the degree of latency, with deeply latent proviruses being mostly located in non-genic regions (112).

As for transcriptionally active cellular genes, the HIV genome needs to be accessible to the transcriptional machinery, and this access is epigenetically controlled. The HIV promoter is wrapped around nucleosomes *nuc-0* and *nuc-1* (113). These histone complexes are posttranslationally modulated by epigenetic marks to induce HIV transcription through acetylation (114, 115), or silencing through deacetylation (116, 117) and methylation (118). In addition, two CpG islands found in the HIV long terminal repeat (LTR) can be methylated and consequently maintain viral repression (119). The protein complex HUSH also contributes to the epigenetic control of HIV transcription by silencing proviruses harboring H3K9me3 methylation marks when the viral proteins *vpr* and *vpx* are not expressed (120, 121).

In addition, initiation of HIV transcription requires the binding of the cellular transcription factor NF- κ B to the viral promoter (122). Notably, binding sites for the ubiquitous transcription factors Sp1 and AP-1 and for the immune cell-specific NFAT (123) are also present in the LTR. The elongation of HIV transcripts is relatively inefficient in latently infected cells: a considerable amount of short, abortive transcripts lacking the poly(A) tail are detected in latently infected cells from PLHIV on ART (36). NF- κ B plays an additional role by recruiting the elongation factor P-TEFb (124). However, this recruitment is mostly accomplished by the viral protein Tat once it has been translated (125). In addition to transcriptional regulation, the lack of viral production by infected cells can also be attributed to post-transcriptional blocks. Unspliced viral RNA and as many as 40 different singly and multiply spliced RNAs can be transcribed from a single genome (126). A defect in splicing may contribute to the absence of viral proteins, particularly Tat, which is required for expression of all viral transcripts (34). Furthermore, viral RNAs accumulate in the nucleus of latently infected cells, and this defect in RNA export can be reverted by overexpressing the polypyrimidine tract-binding protein (PTB) in resting cells (39). Finally, microRNA can prevent the translation of coding viral RNA by complementary homology. HIV infection is known to impact the miRNA profile of the cell (127). Cellular miRNA, such as miR-132 (128), can promote HIV replication indirectly by silencing proteins involved in transcriptional regulation. Conversely, latency can be maintained by miRNAs directly targeting the 3' end of HIV transcripts (miR-28, miR-125b, miR-150, miR-223, miR-382) (129) or the HIV *nef* RNA (miR-29a) (130). Altogether, these

studies highlight the multiplicity of the cellular mechanisms that contribute to the nonproductive state of HIV-infected cells during ART.

Maintenance of latently infected cells by cell proliferation

As discussed above, the majority of persistently infected cells do not produce viral particles during ART. These latently infected cells are maintained through both cell survival signals, preventing HIV-infected cells from death, and cell division signals, promoting the expansion of HIV-infected clones (61, 131). Several studies over the past 10 years have clearly demonstrated that clonal expansions occur in the persistent HIV reservoir, as shown by the duplication of partial and near-full-length HIV genomes and/or integration sites (92, 109, 110, 112, 132–139). These infected clones wax and wane during ART, resulting in a dynamic pool of infected cells over time (133, 137, 140, 141). Several mechanisms contribute to the dynamics of the HIV reservoir (142): (a) antigen-driven proliferation (134, 143, 144), (b) homeostatic proliferation (61, 137, 145), and/or (c) HIV integration–induced proliferation (109, 110, 146). Although antigen-driven proliferation has been proposed as the major driver of HIV persistence, all three phenomena likely coexist (142, 147).

Targeting HIV latency *in vivo*

The ultimate objective of an HIV cure is to eradicate all infected cells from the body or to induce durable immune control of the HIV reservoir (reviewed in ref. 148). Here, we will focus on strategies that target the pool of latently infected cells and that consist of either depletion of these cells or permanent silencing of the integrated proviruses.

The shock-and-kill strategy combines the reactivation of latent proviruses (“shock”) and the elimination of the resulting productively infected cells (“kill”), with the hypothesis that viral cytopathic effects or clearance of virus-expressing cells by the immune system will reduce the size of the latent reservoir (149, 150). To induce proviral expression, a large number of latency-reversing agents (LRAs) have been identified (151). These agents need to be potent enough to

reactivate efficiently most HIV proviruses without inducing a cytokine release syndrome, which would result in major adverse events. This fine balance is a major obstacle to the success of these strategies: the administration of an anti-CD3 antibody together with IL-2, although efficient at reactivating HIV, was highly toxic in PLHIV on ART (152).

LRAs can be divided in several pharmacological classes and can be used alone or in combinations: histone deacetylase inhibitors (HDACis [refs. 117, 153–156]), protein kinase C (PKC) agonists (157–160), P-TEFb agonists (161, 162), second mitochondria-derived activator of caspase (SMAC) mimetics (163–165), and Toll-like receptor (TLR) agonists (166, 167). These agents target different cellular pathways, all of which are nonspecific to the induction of HIV transcription. In fact, most of these LRAs were originally developed for other indications. For instance, the HDACi suberanilohydroxamic acid had been shown to be active against leukemia and breast cancer cell lines (168, 169). Similarly, the fusion inhibitor maraviroc, which was originally used as an antiretroviral drug, has been shown to induce HIV transcription through the NF- κ B pathway *in vivo* and may also be used as an LRA (170).

The majority of clinical trials conducted so far mostly used HDACis such as valproic acid (171–175), vorinostat (176–178), panobinostat (179), and romidepsin (180), and demonstrated a transient increase in cell-associated HIV RNA and/or residual plasma viremia in virally suppressed PLHIV. Low doses of the PKC agonist bryostatin were also recently tested in a phase I clinical trial and did not result in an induction of HIV transcription *in vivo* (181). Disappointingly, none of these studies resulted in a significant decrease in the size of the HIV reservoir in individuals on ART. Several factors may explain these negative results: (a) LRAs may have differential effects between tissues (177); (b) LRAs are not equally efficient in all populations of CD4⁺ T cells, suggesting that they may be largely ineffective in some cellular reservoirs (107, 108); (c) effector cells may be lacking at sites of active viral production such as lymph nodes (14, 15, 17); (d) the persistent immune exhaustion of CD8⁺ T cells may not allow the efficient elimination of productively infected cells (182); (e) some LRAs, particularly HDACis, have been shown to impair cytotoxic effector responses (183) and antigen presentation by APCs (184), which could hamper viral reservoir elimination; and (f) productively infected cells may be inherently resistant to immune-mediated killing through the expression of prosurvival factors (185).

Several improvements have been proposed to increase the efficacy of LRAs at reactivating latent HIV proviruses in individuals on ART, including the use of LRA combinations, development of new pharmacological classes of LRAs, and enhancement of cytotoxic immune responses (186). Overall, a better understanding of the effects of LRAs *in vivo* is needed to improve future shock-and-kill strategies.

The opposite of shock-and-kill strategies, block-and-lock strategies are aimed at promoting permanent silencing of HIV proviruses using latency-promoting agents (LPAs). This approach is based on the hypothesis that HIV latency can be induced in an irreversible way, which would prevent viral rebound upon ART cessation. These LPAs act by inhibiting viral or cellular proteins involved in HIV transcription (187). The best-described LPA is didehydro-cortistatin A (dCA), a Tat inhibitor (188, 189) shown to decrease viral RNA in cells and tissues and delay viral rebound upon ART cessation in a humanized mouse model (189). The efficacy of LPAs at preventing viral rebound in HIV-infected individuals has not been investigated yet.

Another approach to reduce the reservoir of latently infected cells is to permanently inactivate the integrated proviruses. Given the recent development of the CRISPR/Cas9 system, the excision or inactivation of the HIV genome is now theoretically possible (190). Inactivation of the provirus by targeting of different conserved HIV sequences was tested in several *in vitro* models. Although the approach was originally promising (191, 192), it resulted in a long-term escape caused by HIV DNA mutations in the targeted sequences, preventing single-guide RNA recognition (193–196). Nonetheless, HIV proviral genome excision by CRISPR/Cas9 in a humanized mouse model resulted in promising observations (197). Future studies are warranted to determine whether the combination of multiple-guide RNAs targeting different HIV variants and/or genome sites could prevent viral escape.

Conclusions

In individuals on ART, HIV persists at low levels in several tissues and multiple cellular subsets and displays different states of transcriptional and translational activities. The multifaceted aspect of these HIV reservoirs complicates their analysis and the development of efficient therapeutic strategies to target them. The relative contributions of these reservoirs, from cells that continuously produce low levels of viral particles during ART to the extreme case of fully transcriptionally silent genomes, remain unclear. More importantly, the clinically relevant reservoir that causes viral rebound upon ART cessation has not been identified yet. Given the large diversity of the cells in which HIV persists and the multiple molecular mechanisms contributing to viral persistence, studies conducted on bulk populations of cells are unlikely to reveal targetable mechanisms to cure HIV infection. The recent development of single-cell approaches to study the transcriptome and proteome of individual HIV-infected cells (38, 198, 199) will certainly help in this endeavor.

Acknowledgements

The authors are grateful to the individuals who volunteered to participate in the studies reviewed in this manuscript.

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 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 (FRQS, #253292). C.D. is supported by a doctoral fellowship from CIHR (#413313). P.G. is supported by a postdoctoral fellowship from CIHR (#415209).

Declaration of interests

The authors have declared that no competing interests exist.

References

1. Hutter G, Nowak D, Mossner M, Ganepola S, Mussig A, Allers K, et al. Long-term control of HIV by CCR5 Delta32/Delta32 stem-cell transplantation. *N Engl J Med.* 2009;360(7):692-8.
2. Gupta RK, Abdul-Jawad S, McCoy LE, Mok HP, Peppas D, Salgado M, et al. HIV-1 remission following CCR5Delta32/Delta32 haematopoietic stem-cell transplantation. *Nature.* 2019;568(7751):244-8.
3. Davey RT, Jr., Bhat N, Yoder C, Chun TW, Metcalf JA, Dewar R, et al. HIV-1 and T cell dynamics after interruption of highly active antiretroviral therapy (HAART) in patients with a history of sustained viral suppression. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96(26):15109-14.
4. 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;24(7):923-6.
5. Blankson JN, Persaud D, and Siliciano RF. The challenge of viral reservoirs in HIV-1 infection. *Annu Rev Med.* 2002;53:557-93.
6. Eisele E, and Siliciano RF. Redefining the viral reservoirs that prevent HIV-1 eradication. *Immunity.* 2012;37(3):377-88.
7. Ho DD, Neumann AU, Perelson AS, Chen W, Leonard JM, and Markowitz M. Rapid turnover of plasma virions and CD4 lymphocytes in HIV-1 infection. *Nature.* 1995;373(6510):123-6.
8. Wei X, Ghosh SK, Taylor ME, Johnson VA, Emini EA, Deutsch P, et al. Viral dynamics in human immunodeficiency virus type 1 infection. *Nature.* 1995;373(6510):117-22.
9. Fletcher CV, Staskus K, Wietgreffe SW, Rothenberger M, Reilly C, Chipman JG, et al. Persistent HIV-1 replication is associated with lower antiretroviral drug concentrations in lymphatic tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014.
10. Kearney M, Wiegand A, Shao W, McManus WR, Bale MJ, Luke B, et al. Ongoing HIV Replication During ART Reconsidered. *Open Forum Infectious Diseases.* 2017.

11. Lorenzo-Redondo R, Fryer HR, Bedford T, Kim EY, Archer J, Pond SLK, et al. Persistent HIV-1 replication maintains the tissue reservoir during therapy. *Nature*. 2016;530(7588):51-6.
12. Buzon MJ, Massanella M, Llibre JM, Esteve A, Dahl V, Puertas MC, et al. HIV-1 replication and immune dynamics are affected by raltegravir intensification of HAART-suppressed subjects. *Nat Med*. 2010;16(4):460-5.
13. Hatano H, Strain MC, Scherzer R, Bacchetti P, Wentworth D, Hoh R, et al. Increase in 2-long terminal repeat circles and decrease in D-dimer after raltegravir intensification in patients with treated HIV infection: a randomized, placebo-controlled trial. *The Journal of infectious diseases*. 2013;208(9):1436-42.
14. Connick E, Mattila T, Folkvord JM, Schlichtemeier R, Meditz AL, Ray MG, et al. CTL fail to accumulate at sites of HIV-1 replication in lymphoid tissue. *J Immunol*. 2007;178(11):6975-83.
15. Fukazawa Y, Lum R, Okoye AA, Park H, Matsuda K, Bae JY, et al. B cell follicle sanctuary permits persistent productive simian immunodeficiency virus infection in elite controllers. *Nat Med*. 2015;21(2):132-9.
16. Jenabian MA, Costiniuk CT, Mehraj V, Ghazawi FM, Fromentin R, Brousseau J, et al. Immune tolerance properties of the testicular tissue as a viral sanctuary site in ART-treated HIV-infected adults. *AIDS*. 2016;30(18):2777-86.
17. Reuter MA, Del Rio Estrada PM, Buggert M, Petrovas C, Ferrando-Martinez S, Nguyen S, et al. HIV-Specific CD8(+) T Cells Exhibit Reduced and Differentially Regulated Cytolytic Activity in Lymphoid Tissue. *Cell reports*. 2017;21(12):3458-70.
18. Kiniry BE, Ganesh A, Critchfield JW, Hunt PW, Hecht FM, Somsouk M, et al. Predominance of weakly cytotoxic, T-bet(Low)Eomes(Neg) CD8(+) T-cells in human gastrointestinal mucosa: implications for HIV infection. *Mucosal immunology*. 2017;10(4):1008-20.
19. Tauriainen J, Scharf L, Frederiksen J, Naji A, Ljunggren HG, Sonnerborg A, et al. Perturbed CD8(+) T cell TIGIT/CD226/PVR axis despite early initiation of antiretroviral treatment in HIV infected individuals. *Sci Rep*. 2017;7:40354.

20. Damouche A, Pourcher G, Pourcher V, Benoist S, Busson E, Lataillade JJ, et al. High proportion of PD-1-expressing CD4(+) T cells in adipose tissue constitutes an immunomodulatory microenvironment that may support HIV persistence. *Eur J Immunol.* 2017;47(12):2113-23.
21. Gandhi RT, Zheng L, Bosch RJ, Chan ES, Margolis DM, Read S, et al. The effect of raltegravir intensification on low-level residual viremia in HIV-infected patients on antiretroviral therapy: a randomized controlled trial. *PLoS medicine.* 2010;7(8).
22. Dinoso JB, Kim SY, Wiegand AM, Palmer SE, Gange SJ, Cranmer L, 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):9403-8.
23. Hatano H, Hayes TL, Dahl V, Sinclair E, Lee TH, Hoh R, et al. A randomized, controlled trial of raltegravir intensification in antiretroviral-treated, HIV-infected patients with a suboptimal CD4+ T cell response. *The Journal of infectious diseases.* 2011;203(7):960-8.
24. McMahon D, Jones J, Wiegand A, Gange SJ, Kearney M, Palmer S, 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):912-9.
25. Abrahams MR, Joseph SB, Garrett N, Tyers L, Moeser M, Archin N, et al. The replication-competent HIV-1 latent reservoir is primarily established near the time of therapy initiation. *Sci Transl Med.* 2019;11(513).
26. 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.
27. 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.

28. 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.
29. Chun TW, Finzi D, Margolick J, Chadwick K, Schwartz D, and Siliciano RF. In vivo fate of HIV-1-infected T cells: quantitative analysis of the transition to stable latency. *Nat Med*. 1995;1(12):1284-90.
30. 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.
31. 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.
32. 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. *The Journal of infectious diseases*. 2015;212(9):1361-5.
33. Hermankova M, Siliciano JD, Zhou Y, Monie D, Chadwick K, Margolick JB, et al. Analysis of human immunodeficiency virus type 1 gene expression in latently infected resting CD4+ T lymphocytes in vivo. *J Virol*. 2003;77(13):7383-92.
34. 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).
35. Telwatte S, Lee S, Somsouk M, Hatano H, Baker C, Kaiser P, et al. Gut and blood differ in constitutive blocks to HIV transcription, suggesting tissue-specific differences in the mechanisms that govern HIV latency. *PLoS Pathog*. 2018;14(11):e1007357.
36. Lassen KG, Bailey JR, and Siliciano RF. Analysis of human immunodeficiency virus type 1 transcriptional elongation in resting CD4+ T cells in vivo. *J Virol*. 2004;78(17):9105-14.

37. 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.
38. Pardons M, Baxter AE, Massanella M, Pagliuzza A, Fromentin R, Dufour C, et al. Single-cell characterization and quantification of translation-competent viral reservoirs in treated and untreated HIV infection. *PLoS Pathog*. 2019;15(2):e1007619.
39. Lassen KG, Ramyar KX, Bailey JR, Zhou Y, and Siliciano RF. Nuclear retention of multiply spliced HIV-1 RNA in resting CD4+ T cells. *PLoS Pathog*. 2006;2(7):e68.
40. Palmer S, Wiegand AP, Maldarelli F, Bazmi H, Mican JM, Polis M, et al. New real-time reverse transcriptase-initiated PCR assay with single-copy sensitivity for human immunodeficiency virus type 1 RNA in plasma. *J Clin Microbiol*. 2003;41(10):4531-6.
41. Maldarelli F, Palmer S, King MS, Wiegand A, Polis MA, Mican J, et al. ART suppresses plasma HIV-1 RNA to a stable set point predicted by pretherapy viremia. *PLoS Pathog*. 2007;3(4):e46.
42. Bailey JR, Sedaghat AR, Kieffer T, Brennan T, Lee PK, Wind-Rotolo M, 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):6441-57.
43. Sedaghat AR, Siliciano JD, Brennan TP, Wilke CO, and Siliciano RF. Limits on replenishment of the resting CD4+ T cell reservoir for HIV in patients on HAART. *PLoS Pathog*. 2007;3(8):e122.
44. Palmer S, Maldarelli F, Wiegand A, Bernstein B, Hanna GJ, Brun SC, et al. Low-level viremia persists for at least 7 years in patients on suppressive antiretroviral therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(10):3879-84.
45. 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.

46. Imamichi H, Smith M, Adelsberger JW, Izumi T, Scrimieri F, Sherman BT, et al. Defective HIV-1 proviruses produce viral proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2020;117(7):3704-10.
47. Hatano H, Jain V, Hunt PW, Lee TH, Sinclair E, Do TD, et al. Cell-based measures of viral persistence are associated with immune activation and programmed cell death protein 1 (PD-1)-expressing CD4+ T cells. *J Infect Dis*. 2013;208(1):50-6.
48. Stunnenberg M, Sprokholt JK, van Hamme JL, Kaptein TM, Zijlstra-Willems EM, Gringhuis SI, et al. Synthetic Abortive HIV-1 RNAs Induce Potent Antiviral Immunity. *Front Immunol*. 2020;11:8.
49. Cheng L, Ma J, Li J, Li D, Li G, Li F, et al. Blocking type I interferon signaling enhances T cell recovery and reduces HIV-1 reservoirs. *J Clin Invest*. 2017;127(1):269-79.
50. Horsburgh BA, Lee E, Hiener B, Eden JS, Schlub TE, von Stockenstrom S, et al. High levels of genetically-intact HIV in HLA-DR+ memory T-cells indicates their value for reservoir studies. *AIDS*. 2020.
51. 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.
52. Whitney JB, Hill AL, Sanisetty S, Penaloza-MacMaster P, Liu J, Shetty M, et al. Rapid seeding of the viral reservoir prior to SIV viraemia in rhesus monkeys. *Nature*. 2014;512(7512):74-7.
53. Okoye AA, Hansen SG, Vaidya M, Fukazawa Y, Park H, Duell DM, et al. Early antiretroviral therapy limits SIV reservoir establishment to delay or prevent post-treatment viral rebound. *Nat Med*. 2018;24(9):1430-40.
54. Henrich TJ, Hatano H, Bacon O, Hogan LE, Rutishauser R, Hill A, et al. HIV-1 persistence following extremely early initiation of antiretroviral therapy (ART) during acute HIV-1 infection: An observational study. *PLoS medicine*. 2017;14(11):e1002417.

55. Ananworanich J, Chomont N, Eller LA, Kroon E, Tovanabutra S, Bose M, et al. HIV DNA Set Point is Rapidly Established in Acute HIV Infection and Dramatically Reduced by Early ART. *EBioMedicine*. 2016;11:68-72.
56. Leyre L, Kroon E, Vandergeeten C, Sacdalan C, Colby D, Buranapraditkun S, et al. Abundant HIV-infected cells in blood and tissues are rapidly cleared upon ART initiation during acute HIV infection. *Science translational medicine*. 2020;In press.
57. Lamers SL, Rose R, Maidji E, Agsalda-Garcia M, Nolan DJ, Fogel GB, et al. HIV DNA Is Frequently Present within Pathologic Tissues Evaluated at Autopsy from Combined Antiretroviral Therapy-Treated Patients with Undetectable Viral Loads. *J Virol*. 2016;90(20):8968-83.
58. Chaillon A, Gianella S, Dellicour S, Rawlings SA, Schlub TE, Faria De Oliveira M, et al. HIV persists throughout deep tissues with repopulation from multiple anatomical sources. *J Clin Invest*. 2020.
59. Wong JK, and Yukl SA. Tissue reservoirs of HIV. *Curr Opin HIV AIDS*. 2016;11(4):362-70.
60. 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.
61. 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.
62. 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.
63. Dobrowolski C, Valadkhan S, Graham AC, Shukla M, Ciuffi A, Telenti A, et al. Entry of Polarized Effector Cells into Quiescence Forces HIV Latency. *mBio*. 2019;10(2).
64. 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.

65. Chew GM, Fujita T, Webb GM, Burwitz BJ, Wu HL, Reed JS, 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):e1005349.
66. 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.
67. Evans VA, van der Sluis RM, Solomon A, Dantanarayana A, McNeil C, Garsia R, et al. Programmed cell death-1 contributes to the establishment and maintenance of HIV-1 latency. *AIDS.* 2018;32(11):1491-7.
68. Fromentin R, DaFonseca S, Costiniuk CT, El-Far M, Procopio FA, Hecht FM, et al. PD-1 blockade potentiates HIV latency reversal ex vivo in CD4(+) T cells from ART-suppressed individuals. *Nat Commun.* 2019;10(1):814.
69. Kumar NA, Cheong K, Powell DR, da Fonseca Pereira C, Anderson J, Evans VA, et al. The role of antigen presenting cells in the induction of HIV-1 latency in resting CD4(+) T-cells. *Retrovirology.* 2015;12:76.
70. Rezaei SD, Lu HK, Chang JJ, Rhodes A, Lewin SR, and Cameron PU. The Pathway To Establishing HIV Latency Is Critical to How Latency Is Maintained and Reversed. *J Virol.* 2018;92(13).
71. Stevenson M, Stanwick TL, Dempsey MP, and Lamonica CA. HIV-1 replication is controlled at the level of T cell activation and proviral integration. *EMBO J.* 1990;9(5):1551-60.
72. Zack JA, Arrigo SJ, Weitsman SR, Go AS, Haislip A, and Chen IS. HIV-1 entry into quiescent primary lymphocytes: molecular analysis reveals a labile, latent viral structure. *Cell.* 1990;61(2):213-22.
73. Baldauf HM, Pan X, Erikson E, Schmidt S, Daddacha W, Burggraf M, et al. SAMHD1 restricts HIV-1 infection in resting CD4(+) T cells. *Nat Med.* 2012;18(11):1682-7.

74. Pace MJ, Graf EH, Agosto LM, Mexas AM, Male F, Brady T, et al. Directly infected resting CD4+T cells can produce HIV Gag without spreading infection in a model of HIV latency. *PLoS Pathog.* 2012;8(7):e1002818.
75. Coiras M, Bermejo M, Descours B, Mateos E, Garcia-Perez J, Lopez-Huertas MR, et al. IL-7 Induces SAMHD1 Phosphorylation in CD4+ T Lymphocytes, Improving Early Steps of HIV-1 Life Cycle. *Cell Rep.* 2016;14(9):2100-7.
76. Cameron PU, Saleh S, Sallmann G, Solomon A, Wightman F, Evans VA, et al. Establishment of HIV-1 latency in resting CD4+ T cells depends on chemokine-induced changes in the actin cytoskeleton. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(39):16934-9.
77. Chavez L, Calvanese V, and Verdin E. HIV Latency Is Established Directly and Early in Both Resting and Activated Primary CD4 T Cells. *PLoS Pathog.* 2015;11(6):e1004955.
78. Agosto LM, Herring MB, Mothes W, and Henderson AJ. HIV-1-Infected CD4+ T Cells Facilitate Latent Infection of Resting CD4+ T Cells through Cell-Cell Contact. *Cell Rep.* 2018;24(8):2088-100.
79. Gagne M, Michaels D, Schiralli Lester GM, Gummuluru S, Wong WW, and Henderson AJ. Strength of T cell signaling regulates HIV-1 replication and establishment of latency. *PLoS Pathog.* 2019;15(5):e1007802.
80. Evans VA, Kumar N, Filali A, Procopio FA, Yegorov O, Goulet JP, et al. Myeloid dendritic cells induce HIV-1 latency in non-proliferating CD4+ T cells. *PLoS Pathog.* 2013;9(12):e1003799.
81. Belmonte L, Olmos M, Fanin A, Parodi C, Bare P, Concetti H, et al. The intestinal mucosa as a reservoir of HIV-1 infection after successful HAART. *AIDS.* 2007;21(15):2106-8.
82. Chun TW, Nickle DC, Justement JS, Meyers JH, Roby G, Hallahan CW, et al. Persistence of HIV in gut-associated lymphoid tissue despite long-term antiretroviral therapy. *The Journal of infectious diseases.* 2008;197(5):714-20.

83. Yukl SA, Gianella S, Sinclair E, Epling L, Li Q, Duan L, et al. Differences in HIV burden and immune activation within the gut of HIV-positive patients receiving suppressive antiretroviral therapy. *The Journal of infectious diseases*. 2010;202(10):1553-61.
84. Churchill MJ, Gorry PR, Cowley D, Lal L, Sonza S, Purcell DF, et al. Use of laser capture microdissection to detect integrated HIV-1 DNA in macrophages and astrocytes from autopsy brain tissues. *J Neurovirol*. 2006;12(2):146-52.
85. Costiniuk CT, Salahuddin S, Farnos O, Olivenstein R, Pagliuzza A, Orlova M, et al. HIV persistence in mucosal CD4+ T cells within the lungs of adults receiving long-term suppressive antiretroviral therapy. *AIDS*. 2018;32(16):2279-89.
86. Carter CC, Onafuwa-Nuga A, McNamara LA, Riddell Jt, Bixby D, Savona MR, et al. HIV-1 infects multipotent progenitor cells causing cell death and establishing latent cellular reservoirs. *Nat Med*. 2010;16(4):446-51.
87. Durand CM, Ghiaur G, Siliciano JD, Rabi SA, Eisele EE, Salgado 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. *The Journal of infectious diseases*. 2012;205(6):1014-8.
88. Ganor Y, Real F, Sennepin A, Dutertre CA, Prevedel L, Xu L, et al. HIV-1 reservoirs in urethral macrophages of patients under suppressive antiretroviral therapy. *Nat Microbiol*. 2019;4(4):633-44.
89. Launay O, Tod M, Tschöpe I, Si-Mohamed A, Belarbi L, Charpentier C, et al. Residual HIV-1 RNA and HIV-1 DNA production in the genital tract reservoir of women treated with HAART: the prospective ANRS EP24 GYNODYN study. *Antiviral therapy*. 2011;16(6):843-52.
90. Deleage C, Moreau M, Rioux-Leclercq N, Ruffault A, Jegou B, and Dejuq-Rainsford N. Human immunodeficiency virus infects human seminal vesicles in vitro and in vivo. *Am J Pathol*. 2011;179(5):2397-408.

91. 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.
92. Lee GQ, Orlova-Fink N, Einkauf K, Chowdhury FZ, Sun X, Harrington S, et al. Clonal expansion of genome-intact HIV-1 in functionally polarized Th1 CD4+ T cells. *J Clin Invest*. 2017;127(7):2689-96.
93. 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.
94. Vibholm LK, Lorenzi JCC, Pai JA, Cohen YZ, Oliveira TY, Barton JP, et al. Characterization of Intact Proviruses in Blood and Lymph Node from HIV-Infected Individuals Undergoing Analytical Treatment Interruption. *J Virol*. 2019;93(8).
95. Kandathil AJ, Sugawara S, and Balagopal A. Are T cells the only HIV-1 reservoir? *Retrovirology*. 2016;13(1):86.
96. Wong ME, Jaworowski A, and Hearps AC. The HIV Reservoir in Monocytes and Macrophages. *Front Immunol*. 2019;10:1435.
97. Baxter AE, Russell RA, Duncan CJ, Moore MD, Willberg CB, Pablos JL, et al. Macrophage infection via selective capture of HIV-1-infected CD4+ T cells. *Cell Host Microbe*. 2014;16(6):711-21.
98. Massanella M, Bakeman W, Sithinamsuwan P, Fletcher JLK, Chomchey N, Tipsuk S, et al. Infrequent HIV infection of circulating monocytes during antiretroviral therapy. *J Virol*. 2019.
99. Cattin A, Wiche Salinas TR, Gosselin A, Planas D, Shacklett B, Cohen EA, et al. HIV-1 is rarely detected in blood and colon myeloid cells during viral-suppressive antiretroviral therapy. *AIDS*. 2019;33(8):1293-306.
100. 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.

101. 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. *Nat Commun.* 2014;5:5407.
102. Kulpa DA, Talla A, Brehm JH, Ribeiro SP, Yuan S, Bebin-Blackwell AG, et al. Differentiation into an Effector Memory Phenotype Potentiates HIV-1 Latency Reversal in CD4(+) T Cells. *J Virol.* 2019;93(24).
103. Kulpa DA, and Chomont N. HIV persistence in the setting of antiretroviral therapy: when, where and how does HIV hide? *J Virus Erad.* 2015;1(2):59-66.
104. 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 Rep.* 2017;21(3):813-22.
105. 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.
106. Cantero-Perez J, Grau-Exposito J, Serra-Peinado C, Rosero DA, Luque-Ballesteros L, Astorga-Gamaza A, et al. Resident memory T cells are a cellular reservoir for HIV in the cervical mucosa. *Nat Commun.* 2019;10(1):4739.
107. Pardons M, Fromentin R, Pagliuzza A, Routy JP, and Chomont N. Latency-Reversing Agents Induce Differential Responses in Distinct Memory CD4 T Cell Subsets in Individuals on Antiretroviral Therapy. *Cell Rep.* 2019;29(9):2783-95 e5.
108. Grau-Exposito J, Luque-Ballesteros L, Navarro J, Curran A, Burgos J, Ribera E, et al. Latency reversal agents affect differently the latent reservoir present in distinct CD4+ T subpopulations. *PLoS Pathog.* 2019;15(8):e1007991.
109. Wagner TA, McLaughlin S, Garg K, Cheung CY, Larsen BB, Styrchak S, et al. HIV latency. Proliferation of cells with HIV integrated into cancer genes contributes to persistent infection. *Science.* 2014;345(6196):570-3.

110. Maldarelli F, Wu X, Su L, Simonetti FR, Shao W, Hill S, et al. HIV latency. Specific HIV integration sites are linked to clonal expansion and persistence of infected cells. *Science*. 2014;345(6193):179-83.
111. Lenasi T, Contreras X, and Peterlin BM. Transcriptional interference antagonizes proviral gene expression to promote HIV latency. *Cell Host Microbe*. 2008;4(2):123-33.
112. Einkauf KB, Lee GQ, Gao C, Sharaf R, Sun X, Hua S, et al. Intact HIV-1 proviruses accumulate at distinct chromosomal positions during prolonged antiretroviral therapy. *J Clin Invest*. 2019;129(3):988-98.
113. Verdin E, Paras P, Jr., and Van Lint C. Chromatin disruption in the promoter of human immunodeficiency virus type 1 during transcriptional activation. *EMBO J*. 1993;12(8):3249-59.
114. Sheridan PL, Mayall TP, Verdin E, and Jones KA. Histone acetyltransferases regulate HIV-1 enhancer activity in vitro. *Genes Dev*. 1997;11(24):3327-40.
115. Lusic M, Marcello A, Cereseto A, and Giacca M. Regulation of HIV-1 gene expression by histone acetylation and factor recruitment at the LTR promoter. *EMBO J*. 2003;22(24):6550-61.
116. Coull JJ, Romerio F, Sun JM, Volker JL, Galvin KM, Davie JR, et al. The human factors YY1 and LSF repress the human immunodeficiency virus type 1 long terminal repeat via recruitment of histone deacetylase 1. *J Virol*. 2000;74(15):6790-9.
117. Archin NM, Keedy KS, Espeseth A, Dang H, Hazuda DJ, and Margolis DM. Expression of latent human immunodeficiency type 1 is induced by novel and selective histone deacetylase inhibitors. *AIDS*. 2009;23(14):1799-806.
118. Friedman J, Cho WK, Chu CK, Keedy KS, Archin NM, Margolis DM, et al. Epigenetic silencing of HIV-1 by the histone H3 lysine 27 methyltransferase enhancer of Zeste 2. *J Virol*. 2011;85(17):9078-89.
119. Kauder SE, Bosque A, Lindqvist A, Planelles V, and Verdin E. Epigenetic regulation of HIV-1 latency by cytosine methylation. *PLoS Pathog*. 2009;5(6):e1000495.

120. Chougui G, Munir-Matloob S, Matkovic R, Martin MM, Morel M, Lahouassa H, et al. HIV-2/SIV viral protein X counteracts HUSH repressor complex. *Nat Microbiol.* 2018;3(8):891-7.
121. Yurkovetskiy L, Guney MH, Kim K, Goh SL, McCauley S, Dauphin A, et al. Primate immunodeficiency virus proteins Vpx and Vpr counteract transcriptional repression of proviruses by the HUSH complex. *Nat Microbiol.* 2018;3(12):1354-61.
122. Kao SY, Calman AF, Luciw PA, and Peterlin BM. Anti-termination of transcription within the long terminal repeat of HIV-1 by tat gene product. *Nature.* 1987;330(6147):489-93.
123. Van Lint C, Amella CA, Emiliani S, John M, Jie T, and Verdin E. Transcription factor binding sites downstream of the human immunodeficiency virus type 1 transcription start site are important for virus infectivity. *J Virol.* 1997;71(8):6113-27.
124. Barboric M, Nissen RM, Kanazawa S, Jabrane-Ferrat N, and Peterlin BM. NF-kappaB binds P-TEFb to stimulate transcriptional elongation by RNA polymerase II. *Mol Cell.* 2001;8(2):327-37.
125. Wei P, Garber ME, Fang SM, Fischer WH, and Jones KA. A novel CDK9-associated C-type cyclin interacts directly with HIV-1 Tat and mediates its high-affinity, loop-specific binding to TAR RNA. *Cell.* 1998;92(4):451-62.
126. Purcell DF, and Martin MA. Alternative splicing of human immunodeficiency virus type 1 mRNA modulates viral protein expression, replication, and infectivity. *J Virol.* 1993;67(11):6365-78.
127. Houzet L, Yeung ML, de Lame V, Desai D, Smith SM, and Jeang KT. MicroRNA profile changes in human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) seropositive individuals. *Retrovirology.* 2008;5:118.
128. Chiang K, Liu H, and Rice AP. miR-132 enhances HIV-1 replication. *Virology.* 2013;438(1):1-4.
129. Huang J, Wang F, Argyris E, Chen K, Liang Z, Tian H, et al. Cellular microRNAs contribute to HIV-1 latency in resting primary CD4+ T lymphocytes. *Nat Med.* 2007;13(10):1241-7.

130. Ahluwalia JK, Khan SZ, Soni K, Rawat P, Gupta A, Hariharan M, et al. Human cellular microRNA hsa-miR-29a interferes with viral nef protein expression and HIV-1 replication. *Retrovirology*. 2008;5:117.
131. Chomont N, DaFonseca S, Vandergeeten C, Ancuta P, and Sekaly RP. Maintenance of CD4+ T-cell memory and HIV persistence: keeping memory, keeping HIV. *Curr Opin HIV AIDS*. 2011;6(1):30-6.
132. Cohn LB, Silva IT, Oliveira TY, Rosales RA, Parrish EH, Learn GH, et al. HIV-1 integration landscape during latent and active infection. *Cell*. 2015;160(3):420-32.
133. von Stockenstrom S, Odevall L, Lee E, Sinclair E, Bacchetti P, Killian M, et al. Longitudinal Genetic Characterization Reveals That Cell Proliferation Maintains a Persistent HIV Type 1 DNA Pool During Effective HIV Therapy. *The Journal of infectious diseases*. 2015;212(4):596-607.
134. Simonetti FR, Sobolewski MD, Fyne E, Shao W, Spindler J, Hattori J, et al. Clonally expanded CD4+ T cells can produce infectious HIV-1 in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016;113(7):1883-8.
135. Bui JK, Sobolewski MD, Keele BF, Spindler J, Musick A, Wiegand A, et al. Proviruses with identical sequences comprise a large fraction of the replication-competent HIV reservoir. *PLoS Pathog*. 2017;13(3):e1006283.
136. Wiegand A, Spindler J, Hong FF, Shao W, Cyktor JC, Cillo AR, et al. Single-cell analysis of HIV-1 transcriptional activity reveals expression of proviruses in expanded clones during ART. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017;114(18):E3659-E68.
137. Wang Z, Gurule EE, Brennan TP, Gerold JM, Kwon KJ, Hosmane NN, et al. Expanded cellular clones carrying replication-competent HIV-1 persist, wax, and wane. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2018;115(11):E2575-E84.
138. Coffin JM, Wells DW, Zerbato JM, Kuruc JD, Guo S, Luke BT, et al. Clones of infected cells arise early in HIV-infected individuals. *JCI insight*. 2019;4(12).

139. Pinzone MR, VanBelzen DJ, Weissman S, Bertuccio MP, Cannon L, Venanzi-Rullo E, et al. Longitudinal HIV sequencing reveals reservoir expression leading to decay which is obscured by clonal expansion. *Nat Commun.* 2019;10(1):728.
140. Josefsson L, von Stockenstrom S, Faria NR, Sinclair E, Bacchetti P, Killian M, 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):E4987-96.
141. Gantner P, Morand-Joubert L, Sueur C, Raffi F, Fagard C, Lascoux-Combe C, et al. Drug resistance and tropism as markers of the dynamics of HIV-1 DNA quasispecies in blood cells of heavily pretreated patients who achieved sustained virological suppression. *The Journal of antimicrobial chemotherapy.* 2016;71(3):751-61.
142. Kim M, and Siliciano RF. Reservoir expansion by T-cell proliferation may be another barrier to curing HIV infection. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2016;113(7):1692-4.
143. Henrich TJ, Hobbs KS, Hanhauser E, Scully E, Hogan LE, Robles YP, et al. Human Immunodeficiency Virus Type 1 Persistence Following Systemic Chemotherapy for Malignancy. *The Journal of infectious diseases.* 2017;216(2):254-62.
144. Mendoza P, Jackson JR, Oliveira T, Gaebler C, Ramos V, Caskey M, et al. Antigen responsive CD4+ T cell clones contribute to the HIV-1 latent reservoir. *BioRxiv.* 2020.
145. Hosmane NN, Kwon KJ, Bruner KM, Capoferri AA, Beg S, Rosenbloom DI, et al. Proliferation of latently infected CD4(+) T cells carrying replication-competent HIV-1: Potential role in latent reservoir dynamics. *The Journal of experimental medicine.* 2017;214(4):959-72.
146. Cesana D, Santoni de Sio FR, Rudilosso L, Gallina P, Calabria A, Beretta S, et al. HIV-1-mediated insertional activation of STAT5B and BACH2 trigger viral reservoir in T regulatory cells. *Nat Commun.* 2017;8(1):498.
147. Murray AJ, Kwon KJ, Farber DL, and Siliciano RF. The Latent Reservoir for HIV-1: How Immunologic Memory and Clonal Expansion Contribute to HIV-1 Persistence. *J Immunol.* 2016;197(2):407-17.

148. Pitman MC, Lau JSY, McMahon JH, and Lewin SR. Barriers and strategies to achieve a cure for HIV. *The lancet HIV*. 2018;5(6):e317-e28.
149. Kim Y, Anderson JL, and Lewin SR. Getting the "Kill" into "Shock and Kill": Strategies to Eliminate Latent HIV. *Cell Host Microbe*. 2018;23(1):14-26.
150. Hamer DH. Can HIV be Cured? Mechanisms of HIV persistence and strategies to combat it. *Current HIV research*. 2004;2(2):99-111.
151. Ait-Ammar A, Kula A, Darcis G, Verdikt R, De Wit S, Gautier V, et al. Current Status of Latency Reversing Agents Facing the Heterogeneity of HIV-1 Cellular and Tissue Reservoirs. *Front Microbiol*. 2019;10:3060.
152. Prins JM, Jurriaans S, van Praag RM, Blaak H, van Rij R, Schellekens PT, 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):2405-10.
153. Wei DG, Chiang V, Fyne E, Balakrishnan M, Barnes T, Graupe M, 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):e1004071.
154. Tsai P, Wu G, Baker CE, Thayer WO, Spagnuolo RA, Sanchez R, 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):36.
155. Bartholomeeusen K, Fujinaga K, Xiang Y, and Peterlin BM. Histone deacetylase inhibitors (HDACis) that release the positive transcription elongation factor b (P-TEFb) from its inhibitory complex also activate HIV transcription. *The Journal of biological chemistry*. 2013;288(20):14400-7.
156. Martinez-Bonet M, Clemente MI, Serramia MJ, Munoz E, Moreno S, and Munoz-Fernandez MA. Synergistic Activation of Latent HIV-1 Expression by Novel Histone Deacetylase Inhibitors and Bryostatins. *Scientific reports*. 2015;5:16445.

157. Williams SA, Chen LF, Kwon H, Fenard D, Bisgrove D, Verdin E, et al. Prostratin antagonizes HIV latency by activating NF-kappaB. *The Journal of biological chemistry*. 2004;279(40):42008-17.
158. Spina CA, Anderson J, Archin NM, Bosque A, Chan J, Famiglietti M, 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):e1003834.
159. Bullen CK, Laird GM, Durand CM, Siliciano JD, and Siliciano RF. New ex vivo approaches distinguish effective and ineffective single agents for reversing HIV-1 latency in vivo. *Nat Med*. 2014;20(4):425-9.
160. Laird GM, Bullen CK, Rosenbloom DI, Martin AR, Hill AL, Durand CM, et al. Ex vivo analysis identifies effective HIV-1 latency-reversing drug combinations. *J Clin Invest*. 2015;125(5):1901-12.
161. Jiang G, Mendes EA, Kaiser P, Wong DP, Tang Y, Cai I, 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):e1005066.
162. Darcis G, Kula A, Bouchat S, Fujinaga K, Corazza F, Ait-Ammar A, 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):e1005063.
163. Campbell GR, Bruckman RS, Chu YL, Trout RN, and Spector SA. SMAC Mimetics Induce Autophagy-Dependent Apoptosis of HIV-1-Infected Resting Memory CD4+ T Cells. *Cell Host Microbe*. 2018;24(5):689-702 e7.
164. Pache L, Dutra MS, Spivak AM, Marlett JM, Murry JP, Hwang Y, 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):345-53.
165. Nixon CC, Mavigner M, Sampey GC, Brooks AD, Spagnuolo RA, Irlbeck DM, et al. Systemic HIV and SIV latency reversal via non-canonical NF-kappaB signalling in vivo. *Nature*. 2020;578(7793):160-5.

166. Lim SY, Osuna CE, Hraber PT, Hesselgesser J, Gerold JM, Barnes TL, et al. TLR7 agonists induce transient viremia and reduce the viral reservoir in SIV-infected rhesus macaques on antiretroviral therapy. *Sci Transl Med*. 2018;10(439).
167. Macedo AB, Novis CL, De Assis CM, Sorensen ES, Moszczynski P, Huang SH, et al. Dual TLR2 and TLR7 agonists as HIV latency-reversing agents. *JCI insight*. 2018;3(19).
168. Huang L, and Pardee AB. Suberoylanilide hydroxamic acid as a potential therapeutic agent for human breast cancer treatment. *Mol Med*. 2000;6(10):849-66.
169. Richon VM, Emiliani S, Verdin E, Webb Y, Breslow R, Rifkind RA, et al. A class of hybrid polar inducers of transformed cell differentiation inhibits histone deacetylases. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95(6):3003-7.
170. Madrid-Elena N, Garcia-Bermejo ML, Serrano-Villar S, Diaz-de Santiago A, Sastre B, Gutierrez C, et al. Maraviroc Is Associated with Latent HIV-1 Reactivation through NF-kappaB Activation in Resting CD4(+) T Cells from HIV-Infected Individuals on Suppressive Antiretroviral Therapy. *J Virol*. 2018;92(9).
171. Archin NM, Eron JJ, Palmer S, Hartmann-Duff A, Martinson JA, Wiegand A, et al. Valproic acid without intensified antiviral therapy has limited impact on persistent HIV infection of resting CD4+ T cells. *AIDS*. 2008;22(10):1131-5.
172. Archin NM, Cheema M, Parker D, Wiegand A, Bosch RJ, Coffin JM, 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):e9390.
173. Routy JP, Tremblay CL, Angel JB, Trottier B, Rouleau D, Baril JG, 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 medicine*. 2012;13(5):291-6.
174. Sagot-Lerolle N, Lamine A, Chaix ML, Boufassa F, Aboulker JP, Costagliola D, et al. Prolonged valproic acid treatment does not reduce the size of latent HIV reservoir. *AIDS*. 2008;22(10):1125-9.

175. Siliciano JD, Lai J, Callender M, Pitt E, Zhang H, Margolick JB, et al. Stability of the latent reservoir for HIV-1 in patients receiving valproic acid. *The Journal of infectious diseases*. 2007;195(6):833-6.
176. Archin NM, Liberty AL, Kashuba AD, Choudhary SK, Kuruc JD, Crooks AM, et al. Administration of vorinostat disrupts HIV-1 latency in patients on antiretroviral therapy. *Nature*. 2012;487(7408):482-5.
177. Elliott JH, Wightman F, Solomon A, Ghneim K, Ahlers J, Cameron MJ, et al. Activation of HIV transcription with short-course vorinostat in HIV-infected patients on suppressive antiretroviral therapy. *PLoS Pathog*. 2014;10(10):e1004473.
178. Archin NM, Kirchherr JL, Sung JA, Clutton G, Sholtis K, Xu Y, et al. Interval dosing with the HDAC inhibitor vorinostat effectively reverses HIV latency. *J Clin Invest*. 2017;127(8):3126-35.
179. Rasmussen TA, Tolstrup M, Brinkmann CR, Olesen R, Erikstrup C, Solomon 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. *The lancet HIV*. 2014;1(1):e13-21.
180. Sogaard OS, Graversen ME, Leth S, Olesen R, Brinkmann CR, Nissen SK, et al. The Depsipeptide Romidepsin Reverses HIV-1 Latency In Vivo. *PLoS Pathog*. 2015;11(9):e1005142.
181. Gutierrez C, Serrano-Villar S, Madrid-Elena N, Perez-Elias MJ, Martin ME, Barbas C, et al. Bryostatins for latent virus reactivation in HIV-infected patients on antiretroviral therapy. *AIDS*. 2016;30(9):1385-92.
182. Trautmann L, Janbazian L, Chomont N, Said EA, Gimmig S, Bessette B, et al. Upregulation of PD-1 expression on HIV-specific CD8+ T cells leads to reversible immune dysfunction. *Nat Med*. 2006;12(10):1198-202.
183. Jones RB, O'Connor R, Mueller S, Foley M, Szeto GL, Karel D, et al. Histone deacetylase inhibitors impair the elimination of HIV-infected cells by cytotoxic T-lymphocytes. *PLoS Pathog*. 2014;10(8):e1004287.

184. Boucau J, Das J, Joshi N, and Le Gall S. Latency reversal agents modulate HIV antigen processing and presentation to CD8 T cells. *PLoS Pathog.* 2020;16(3):e1008442.
185. Ren Y, Huang SH, Patel S, Conce Alberto WD, Magat D, Ahimovic DJ, et al. BCL-2 antagonism sensitizes cytotoxic t cell-resistant hiv reservoirs to elimination ex vivo. *J Clin Invest.* 2020.
186. Sengupta S, and Siliciano RF. Targeting the Latent Reservoir for HIV-1. *Immunity.* 2018;48(5):872-95.
187. Vargas B, Giacobbi NS, Sanyal A, Venkatachari NJ, Han F, Gupta P, et al. Inhibitors of Signaling Pathways That Block Reversal of HIV-1 Latency. *Antimicrobial agents and chemotherapy.* 2019;63(2).
188. Mousseau G, Kessing CF, Fromentin R, Trautmann L, Chomont N, and Valente ST. The Tat Inhibitor Didehydro-Cortistatin A Prevents HIV-1 Reactivation from Latency. *mBio.* 2015;6(4):e00465.
189. Kessing CF, Nixon CC, Li C, Tsai P, Takata H, Mousseau G, 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):600-11.
190. Xiao Q, Guo D, and Chen S. Application of CRISPR/Cas9-Based Gene Editing in HIV-1/AIDS Therapy. *Frontiers in cellular and infection microbiology.* 2019;9:69.
191. Bialek JK, Dunay GA, Voges M, Schafer C, Spohn M, Stucka R, et al. Targeted HIV-1 Latency Reversal Using CRISPR/Cas9-Derived Transcriptional Activator Systems. *PLoS One.* 2016;11(6):e0158294.
192. Zhu W, Lei R, Le Duff Y, Li J, Guo F, Wainberg MA, et al. The CRISPR/Cas9 system inactivates latent HIV-1 proviral DNA. *Retrovirology.* 2015;12:22.
193. Ueda S, Ebina H, Kanemura Y, Misawa N, and Koyanagi Y. Anti-HIV-1 potency of the CRISPR/Cas9 system insufficient to fully inhibit viral replication. *Microbiol Immunol.* 2016;60(7):483-96.

194. Wang G, Zhao N, Berkhout B, and Das AT. CRISPR-Cas9 Can Inhibit HIV-1 Replication but NHEJ Repair Facilitates Virus Escape. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*. 2016;24(3):522-6.
195. Wang Z, Pan Q, Gendron P, Zhu W, Guo F, Cen S, et al. CRISPR/Cas9-Derived Mutations Both Inhibit HIV-1 Replication and Accelerate Viral Escape. *Cell Rep*. 2016;15(3):481-9.
196. Yoder KE, and Bundschuh R. Host Double Strand Break Repair Generates HIV-1 Strains Resistant to CRISPR/Cas9. *Scientific reports*. 2016;6:29530.
197. Yin C, Zhang T, Qu X, Zhang Y, Putatunda R, Xiao X, et al. In Vivo Excision of HIV-1 Provirus by saCas9 and Multiplex Single-Guide RNAs in Animal Models. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*. 2017;25(5):1168-86.
198. 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.
199. 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.

Figure legends

Figure 1: Distinguishing HIV persistence and HIV latency. During untreated HIV infection, the majority of infected cells are short-lived: HIV viremia is sustained by a dynamic process involving continuous rounds of de novo infection. Initiation of ART (blue dashed lines) leads to a dramatic reduction in the levels of viral replication and in the frequency of infected cells. Residual viremia persists and can originate from low levels of ongoing replication or, more likely, from the continuous production of viral particles from stable reservoirs. The majority of infected cells in PLHIV on ART do not produce viral particles and are defined as latently infected cells. Although the production of spliced transcripts or viral proteins is rare, a relatively large fraction of these cells produce short, abortive viral transcripts. Complete silencing of HIV genomes may also occur when epigenetic regulators repress the LTR transcriptional activity.

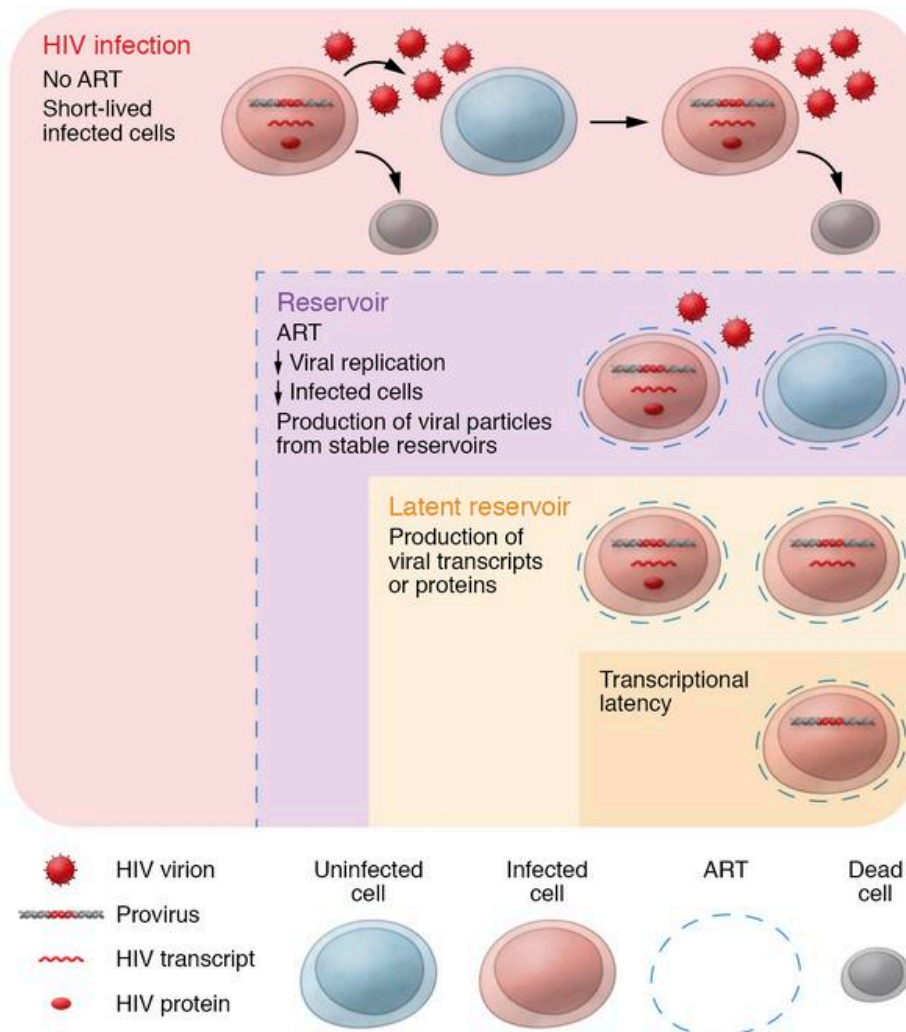


Figure 2: Models for the establishment of HIV latency. Postactivation latency refers to a phenomenon by which activated productively infected CD4+ T cells revert back to a quiescent state, which is accompanied by the silencing of the HIV promoter. In preactivation latency, resting CD4+ T cells, which are usually refractory to HIV infection, become permissive and establish latency directly (i.e., in the absence of T cell activation).

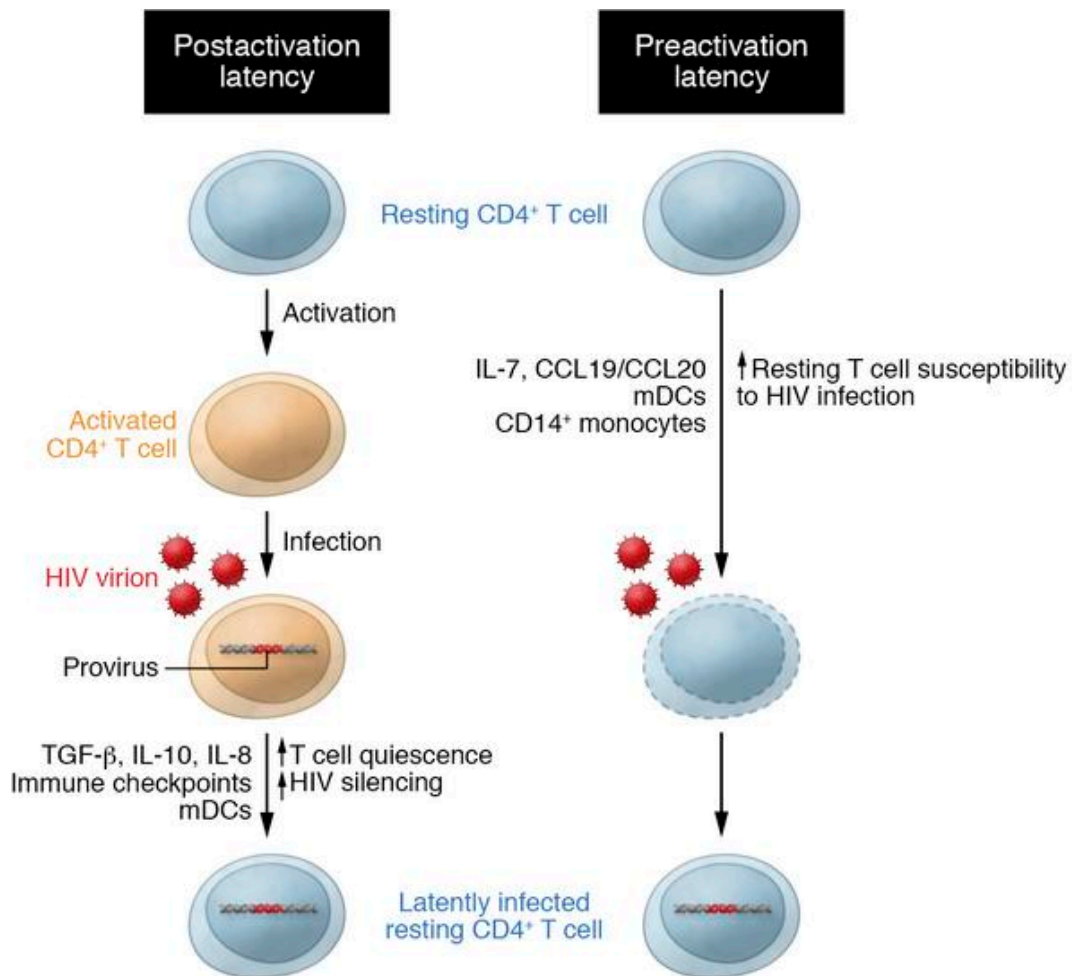


Figure 3: Mechanisms and targets of HIV latency. HIV silencing is regulated by key control elements acting on (i) HIV transcription initiation (histone acetylation/deacetylation, histone and DNA methylation, transcription factors), (ii) HIV transcription elongation (positive transcription elongation factor b [P-TEFb] and viral protein Tat), (iii) HIV RNA export (polypyrimidine tract-binding protein [PTB]), and (iv) HIV RNA degradation (miRNAs). Pathways promoting HIV expression are shown with black arrows, whereas those inhibiting HIV expression are shown in red. These pathways can be targeted *in vivo* in order to reverse HIV latency (latency-reversing agents [LRAs], purple), promote HIV latency (latency-promoting agents [LPAs], blue), or edit the HIV genome (CRISPR/Cas9, green).

