



HAL
open science

Caractérisation et rôle des lymphocytes T CD4+ mémoires SAMHD1low au cours de l'infection par le VIH-1

Lyliya Hani

► **To cite this version:**

Lyliya Hani. Caractérisation et rôle des lymphocytes T CD4+ mémoires SAMHD1low au cours de l'infection par le VIH-1. Médecine humaine et pathologie. Université Paris-Est, 2018. Français. NNT : 2018PESC0087 . tel-02396985

HAL Id: tel-02396985

<https://theses.hal.science/tel-02396985>

Submitted on 6 Dec 2019

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

**THÈSE DE DOCTORAT DE
L'UNIVERSITÉ PARIS-EST**

Ecole doctorale SVS - Sciences de la Vie et de la Santé
Spécialité : Biologie Cellulaire et Moléculaire

Présentée et soutenue publiquement le 19 décembre 2018 par
Lylià HANI

En vue de l'obtention du grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ PARIS-EST

**Caractérisation et rôle des lymphocytes T CD4⁺ mémoires
SAMHD1^{low} au cours de l'infection par le VIH-1**

Devant le jury composé de

Pr Jean-Daniel LELIEVRE

Dr Christine BOURGEOIS

Pr Guislaine CARCELAIN

Dr Victor APPAY

Pr Constance DELAUGERRE

Dr Nabila SEDDIKI

Président

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Examineur

Directeur de thèse

Remerciements

J'adresse mes sincères remerciements au Dr Christine BOURGEOIS et au Pr Guislaine CARCELAIN pour avoir accepté d'être rapporteurs de mon mémoire de thèse et ainsi d'évaluer mon travail. Mes remerciements vont également au Dr Victor APPAY et au Pr Constance DELAUGERRE pour avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse en tant qu'examineurs. Enfin, je remercie chaleureusement le Pr Jean-Daniel LELIEVRE qui a présidé mon jury de thèse.

Je tiens particulièrement à remercier le Dr Nabila SEDDIKI pour avoir dirigé cette thèse et de m'avoir guidée tout au long de ce parcours doctoral. Merci pour votre bienveillance, vos encouragements dans mes moments de doute, merci de m'avoir transmis cette curiosité scientifique et cette passion contagieuse et toujours extrêmement positive, merci pour votre ouverture d'esprit qui m'a permis d'aller là où SAMHD1 a bien voulu nous emmener.

Mes remerciements s'adressent ensuite au Pr. Yves LEVY et au Pr. Jean-Daniel LELIEVRE qui m'ont accueillie dans leur laboratoire, me donnant ainsi la chance de réaliser ce travail de thèse dans un environnement scientifique de qualité.

Je remercie tous nos collaborateurs, particulièrement le Pr Constance DELAUGERRE, le Dr Antoine Chaillon, le Dr Dr Laurent Hocqueloux et le Pr Olivier Schwartz. Merci à tous pour votre aide et vos conseils.

Un grand merci à toi Marie-Laure Néré de m'avoir encadrée durant l'année passée à Saint-Louis, pour ta patience, ta rigueur et ta bienveillance. Je remercie également Maud S. et les habitantes du petit bureau si chaleureux : Séverine, Audrey et Delphine, pour m'avoir si gentiment accueillie dans leur petit groupe, pour les bons moments de discussion dans la cuisine, pour les instants « thé » du matin et du soir que vous avez partagé avec moi et pour votre bonne humeur de tous les jours.

Je tiens à remercier toutes les personnes que j'ai pu croiser, connaître et apprécier au sein de l'unité, tous ceux qui ont tenté et su faire de l'U955 un endroit où il fait bon de travailler, dans la bonne humeur, et autour de bonnes choses à déguster. Ce fut un plaisir au quotidien de travailler avec vous tous !

Je remercie Nicolas RUFFIN et Vedran BREZAR sans qui j'aurais été perdue au début. Apprendre à travailler à vos côtés a été un réel plaisir. Merci Nicolas pour ta patience et ton enthousiasme, et toi Vedran pour ta confiance durant ma première année de thèse, et pour ton amitié et ta sincérité. Ton départ a laissé un grand vide.

Je tiens à remercier très chaleureusement Corinne Crief. Ma très chère Coco, tu es vraiment le cœur de cette équipe. Tu m'as été d'un grand soutien tout au long de cette aventure qu'est la thèse, tu as été mon rayon de soleil. Merci pour ton écoute et ta joie de vivre, ta présence douce, réconfortante et bienveillante, pour tout ce que tu m'as appris et pour tout l'amour que tu m'as apporté. Merci à Lola, Audrey, Mubashira, Jérôme et Axelle, je garderai un très bon souvenir des moments que l'on a pu passer ensemble et de cette très belle amitié que l'on a pu

noyer. Merci pour votre bonne humeur et votre soutien constant, mes « pom-pom girls », toujours prêts à recharger les batteries, mais aussi les réserves de chocolat et de thé ! Sans vous cette thèse n'aurait pas eu la même saveur... Ah cette saveur de R.Pomp et de Sangria !!! Merci Lola pour ta positivité, ton écoute sans faille, tes encouragements et tes expressions qui n'ont jamais cessé de me faire rire. Merci de m'avoir appris que je n'avais pas les cheveux bleus et surtout que je n'étais pas une cellule SAMHD1low... Merci Audrey pour ton soutien et ta bienveillance, ton calme et ta patience m'ont souvent fait me demander pourquoi je m'énervais pour des choses insignifiantes. Mubashira, you are and became someone really special to me. Of every discussion we have had, I have learned something special about life. Thank you. Stay as you are! Ma petite Axelle, ta douceur, ta gentillesse et... tes post-it rose-bleu-vert manquent cruellement au bureau depuis ton départ. Je suis certaine que tu auras une brillante carrière dans ce qu'il te plaira! Merci « JJ-la frite » pour ton soutien et ton humour, tes astuces, tes conseils, et ta solidarité ! Je te souhaite bon courage, ainsi qu'à Lola, la fin de la thèse est proche et je suis de tout cœur avec vous !

Je tiens à remercier très chaleureusement Cyril Planchais pour avoir été un voisin parfait, un confident et un ami. Ton arrivée au labo fut une réelle bouffée d'oxygène... Tu es parti trop tôt mais nos discussions autour d'un verre continuent, malgré le timing ultra serré et nos emplois du temps de ministre... Mon ami Michele Boniotto, derrière ta carapace de dur à cuir se cache une personne exceptionnelle et sensible. Thank you for all the support and the friendship you've giving me through these years. Merci donc à Cyril et Michele, mais également à Alexandre Lederle pour m'avoir appris (en plus d'autres choses bien plus scientifiques) que j'étais encore trop jeune et naïve... pour connaître certaines choses de la vie... et pour faire certaines expériences aussi... hahahhh... J'espère avoir été assez vague...

Merci à Aurélie G. et Adeline H. pour les innombrables heures de tri à surveiller la fameuse goutte, votre patience et votre disponibilité. Je pense ne pas connaître d'autres personnes capables de gérer un trieur tel que le votre, dans la bonne humeur, le sourire et la bienveillance. Merci aussi pour les bons moments, les pauses et discussions à la fac et à l'hôpital.

Je tiens à remercier les Drs Hakim Hocini, Christine Lacabaratz et Sylvain Cardinaud, ainsi que les Prs Véronique Guodot et Sophie HÛE pour toutes nos discussions scientifiques, pour tous vos conseils et commentaires. Merci Mathieu S. pour ta gentillesse et ta sincérité, et pour m'avoir donné mon premier cours de danse à Madrid, quel souvenir inoubliable!!! Je te souhaite beaucoup de succès et une belle fin de thèse. Merci à Laure, Cindy, Francette, Lydia, Aurélie et Emile pour leur gentillesse et leur bonne humeur, ainsi qu'aux anciens : Inna, Mehdi, Aubin, Tasnime, Diane et Thomas.

Un grand merci à mes amis hors labo (oui oui, il y a une vie en dehors du labo). Ceux qui ne savent pas ce qu'est un P2 ou ce que signifie le terme "maniper", je pense particulièrement à mon amie de toujours Kawtar, à Asma, Narimane, Nesrine, Sara et Farawla, c'est une vraie bouffée d'air frais que de discuter avec vous. Évasion garantie vers un "quelque part" bien loin de la thèse... Et puis, que serait la vie parisienne sans vous...

Un immense merci à mes fantastiques: Samir, Amine et Hakim, ainsi qu'à tous mes cousins/cousines et mes tontons Karim et Mustapha et tata Fetta. Merci à tous d'avoir contribué à rendre notre vie Parisienne aussi chaleureuse et pleine de surprises. Merci pour votre soutien inconditionnel dans les bons comme dans les moins bons moments.

Ma Chahinez, bien que tu sois loin, tu as toujours été présente! Merci de m'avoir soutenu, d'avoir cru en moi et su trouver les mots justes pour me faire sourire en toutes circonstances. Merci à mes frères Moncef et Koceila de croire toujours en moi, de me booster et d'être toujours à mes côtés.

Maman, papa, comment puis-je vous remercier... Vous avez fait tant de sacrifices pour que je sois là où j'en suis aujourd'hui! Partir loin de vous a été la plus douloureuse des choses que j'ai eu à faire jusqu'à présent. Un merci, même immense, ne serait pas suffisant pour vous, vous m'avez poussé à aller plus loin que tous ce que j'aurai pu espérer. Merci de m'avoir inculquée vos valeurs, merci pour votre amour inconditionnel, merci de m'avoir toujours soutenue dans mes choix et de m'avoir encouragée et aidée à aller au bout de mes projets. J'ai compris grâce à vous ce que signifiait l'expression "tout donner" car oui, vous m'avez littéralement tout donné. J'arrive enfin au bout de cette thèse grâce à vous et pour vous.

Enfin, merci à toi Billel. Tu as vécu cette thèse aussi intensément que moi, tu m'as soutenu sans aucune faille tout au long de cette expérience, tu as cru en moi, quand moi j'ai douté. Merci d'être celui que tu es. Ta force, ton calme et ta patience nous feront relever tous les défis.

Merci à tous ceux que j'oublie de citer...

Table des matières

ABREVIATIONS	9
LISTE DES FIGURES	13
INTRODUCTION	17
I – L’infection par le virus de l’immunodéficience humaine de type 1 (VIH-1)	17
I. 1. Situation épidémiologique	17
I. 2. Origines du virus	18
I. 3. Etapes de l’infection par le VIH-1	21
I. 3. a. Les modes de transmission de l’infection par le VIH-1	21
I. 3. b. Les stades de l’infection par le VIH-1	21
I. 3. c. La dissémination du virus	23
I. 4. VIH-1: Structure et diversité	24
I. 4. a. L’organisation des particules virales	24
I. 4. b. L’organisation du génome viral	25
I. 4. c. Les cibles cellulaires du VIH-1	26
I. 4. d. Le cycle de vie du VIH-1	27
I. 4. e. La diversité virale et la notion de compartimentation	29
I. 5. Répercussions de l’infection sur le système immunitaire	35
I. 5. a. L’élimination des lymphocytes T CD4 ⁺	35
I. 5. b. La translocation microbienne	38
I. 5. c. L’épuisement du système immunitaire : inflammation et activation	40
I. 6. Contrôle de l’infection et de rémission de la maladie	42
II. Le VIH-1 et le facteur de restriction SAMHD1	45
II. 1. Caractéristiques et fonctions des facteurs de restriction, Mécanismes d’échappement viral	45

Article.	Proliferative memory SAMHD1 ^{low} CD4 ⁺ T cells harbor high levels of HIV-1 DNA with compartmentalized HIV-1 populations. PLoS Pathogens, 2018 (soumis)	153
DISCUSSION		189
ANNEXES		203
Annexe 1.	Caractéristiques physiopathologiques des patients de la cohorte HIV-1+	205
Annexe 2.	Article. Negative modulation of suppressive HIV-specific regulatory T cells by IL-2 adjuvanted therapeutic vaccine. PLoS Pathogens, 2017	211
Annexe 3.	Revue. From dendritic cells to B cells dysfunctions during HIV-1 infection: T follicular helper cells at the crossroads. Immunology, 2017	233
Annexe 4.	Optimisation du protocole d'extraction d'ARN à partir de cellules fixées	245
Annexe 5.	Figures supplémentaires	257
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES		263

ABREVIATIONS

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

AGS : Syndrome d'Aicardi-Goutières

AICD : Activation-Induced Cell Death

APOBEC3G : apolipoprotein B mRNA editing enzyme catalytic polypeptide-like 3

ARN : Acide RiboNucléique

ARV : Antirétroviraux

ATP : Adénosine Triphosphate

BHE : Barrière Hémato-Encéphalique

CA : Capside

c-ART : Thérapie AntiRétrovirale (combinaison AntiRetroviral Therapy)

CCR : Récepteur aux Chimiokines CC

CCR5 : C-C motif Chemokine Receptor type 5

CD : Classe de Différenciation

CDC : Center for Disease Control and Prevention

CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité

CRF : Circulating Recombinant Forms

CTL : Cytotoxic T Lymphocyte

CTLA-4 : Cytotoxic T-lymphocyte Associated protein 4

CXCR4 : C-X-C motif Chemokine Receptor type 4

DC : Cellules Dendritiques

dGTP : déoxyguanosine triphosphate

dNTP : déoxynucléoside triphosphate

EIAV : Virus de l'Anémie Infectieuse des Equidés

GALT : Tissu lymphoïde associé au tube digestif (Gut-Associated Lymphoid Tissues)

G-CSF : Granulocyte-Colony Stimulating Factor

Gp : GlycoProtéine

GTP : guanosine triphosphate

HTLV : Human T-Lymphotropic Virus

ICOS : Inducible T cell Co-Stimulator

IL : Interleukine

IN : Intégrase

IUPM : Infectious Units Per Million cells
LAG-3 : Protéine du gène-3 d'activation des lymphocytes
LAV : Lymphadenopathy Associated Virus
LCR : Liquide Céphalo-Rachidien
LTNP : Long-Term NonProgressors
LTR : Long Terminal Repeat
MA : Matrice
MLV : Virus de la leucémie murine B ou N tropiques
MPMV : Mason-Pfizer Monkey virus
NC : Nucléocapside
NK : Natural Killer
NSC : Non-Spermatozoal Cells)
PBMC : cellules mononuclées du sang périphérique (Peripheral Blood Mononuclear Cells)
PCR : Polymérase Chain Reaction
PD-1 : Protéine de mort cellulaire programmée (Programmed cell Death-1)
PIC : Complexe de Pré-intégration
PR : Protéase
PRR : Pattern Recognition Receptors
QVOA : The Quantitative Viral Outgrowth Assay
RT : Transcriptase inverse
SAMHD1 : Sterile Alpha Motif and Histidine-aspartate Domain-containing protein 1
SIDA : Syndrome d'ImmunoDéficiency Acquis
SIV : Simian Immunodéficiency Virus
SNC : Système Nerveux Central
TCM : T Centrale Mémoire
TEM : T Effectrice Mémoire
Tfh : Lymphocytes T auxiliaires folliculaires
Tim-3 : T-cell Immunoglobulin and Mucin-domain containing-3
TN : Lymphocyte T Naïf
TNF α Facteur de necrose tumorale (Tumor Necrosis Factor)
Treg : Lymphocytes T régulateurs
TRIM5 α : Tripartite motif-containing protein 5 α

TRM : T Résidente Mémoire

TSCM : T Mémoire Souche

TTD : T Terminale Différenciée

TTM : T Transitionnelle Mémoire

VIB : Virus de l'Immunodéficience Bovin

VIF : Virus de l'Immunodéficience Féline

VIH : Virus de l'Immunodéficience Humaine

VISCONTI : Virological and Immunological Studies in CONTrollers after Treatment Interruption

LISTE DES FIGURES

- Figure 1. Estimation du nombre de personnes vivant avec le VIH-1 en 2016 par région mondiale
- Figure 2. Répartition mondiale des sous-types de VIH-1 du groupe M et des formes circulantes recombinantes
- Figure 3. Cinétique de paramètres immunologiques et virologiques dans l'infection par le VIH-1
- Figure 4. Organisation des particules rétrovirales
- Figure 5. Représentation du génome du VIH-1
- Figure 6. Cycle de vie du VIH-1 dans une cellule hôte
- Figure 7. VIH-1 et quasi-espèce virale
- Figure 8. Populations de VIH-1 dans le sang et le tractus génital masculin
- Figure 9. Rôles de l'apoptose dépendant de la caspase-3 et de la pyroptose dépendant de la caspase-1 dans la déplétion des lymphocytes T CD4⁺ au cours de l'infection par le VIH-1
- Figure 10. Mesures quantitatives et qualitatives des paramètres virologiques et immunologiques au cours de l'infection par le VIH-1
- Figure 11. Cas de rémission transitoire ou prolongée de la maladie après traitement antirétroviral
- Figure 12. Interaction du VIH-1 avec des facteurs de restriction et de résistance au cours de son cycle de vie
- Figure 13. Schéma de l'activité dNTPase de SAMHD1 et formation séquentielle des tétramères
- Figure 14. Représentation schématique des différents mécanismes de restriction médiés par SAMHD1
- Figure 15. Représentation schématique des génomes du VIH-1 et du VIH-2
- Figure 16. Définition du réservoir du VIH-1
- Figure 17. Les mécanismes de la persistance du VIH-1 au cours du traitement antirétroviral c-ART
- Figure 18. Représentation schématique des différents mécanismes contribuant à la persistance du VIH-1.
- Figure 19. Hétérogénéité des lymphocytes Th17

- Figure 20. Les sanctuaires anatomiques du VIH-1
- Figure 21. Représentation schématique décrivant la classification de l'ADN du VIH-1 retrouvé chez les individus infectés sous traitement c-ART suppressif
- Figure 22. Représentation des différentes formes virales dans les cellules infectées latentes et productives et les tests de quantification principaux des différentes formes d'ADN VIH-1 et d'ARN VIH-1.
- Figure 23. Tableau récapitulatif des tests courants de détection des différentes formes d'ADN du VIH-1 persistant

INTRODUCTION

Introduction

I. L'infection par le virus de l'immunodéficience humaine de type 1 « VIH-1 »

I. 1. Situation épidémiologique

Le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) est l'un des plus redoutables agents pathogènes de l'histoire de l'humanité, à l'origine d'une pandémie conduisant, en l'absence de traitement, au syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA).

Les premiers cas de SIDA furent identifiés en 1981 par le CDC «Center for Disease Control and Prevention» d'Atlanta, alors que de jeunes homosexuels masculins étaient atteints de pneumocystose pulmonaire et de sarcome de Kaposi cutané révélant une immunodépression profonde d'installation rapide et de cause inconnue (Gottlieb, Schroff et al. 1981). Le virus fut isolé en 1983 par des chercheurs français: il s'agit d'un rétrovirus proche des HTLV-1 et HTLV-2 précédemment caractérisés et initialement nommé *Lymphadenopathy Associated Virus* (LAV) (Barre-Sinoussi, Chermann et al. 1983). Séquencé pour la première fois en 1985, le virus fut classé dans le genre plus restreint des lentivirus, plus tard nommé VIH-1 et reconnu comme responsable de la pandémie de SIDA (Wain-Hobson, Sonigo et al. 1985, Coffin, Haase et al. 1986). Le SIDA est caractérisé par un ensemble de symptômes causés par la perte de fonctionnalité du système immunitaire, favorisant ainsi le développement d'infections opportunistes les rendant mortelles.

Depuis la découverte des premiers cas il y a plus de 35 ans, près de 35,4 millions de personnes sont décédées de suite de maladies liées au SIDA, dont 940 000 en 2017. De fait, si les traitements permettent d'améliorer significativement la qualité de vie des malades, ceux-ci ne permettent pas de les guérir. On comptabilise 36.9 millions de personnes vivant avec le VIH-1, dont 1.8 millions de nouvelles infections en 2017 (ONUSIDA 2018). Grâce à l'utilisation de plus en plus large des antirétroviraux - en Juillet 2018, 21.7 millions de personnes vivant avec le VIH-1 avaient accès à la thérapie. L'utilisation de traitements antirétroviraux a considérablement changé l'épidémiologie mondiale de l'infection par le VIH-1, néanmoins, ce virus continue de représenter l'une des causes principales de morbidité.

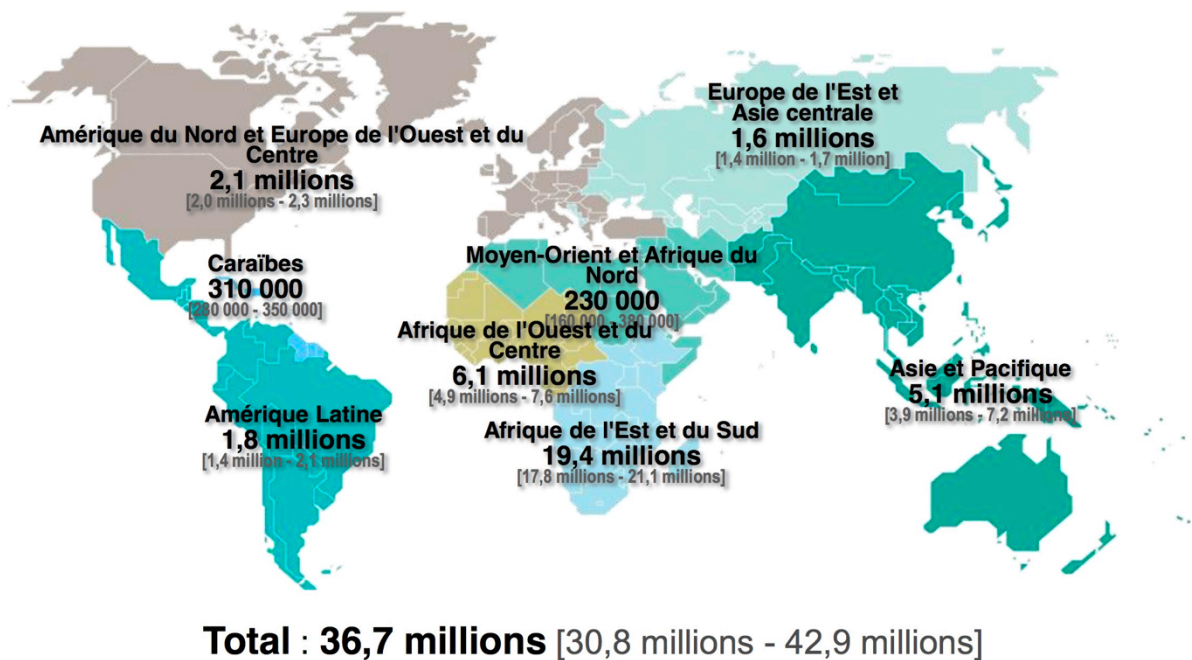


Figure 1. Estimation du nombre de personnes vivant avec le VIH-1 en 2016 par région mondiale (ONUSIDA 2016)

La prévention reste le meilleur moyen de lutter contre le SIDA à l'heure actuelle, mais les progrès réalisés en termes de thérapies antirétrovirales méritent d'être soulignés. En effet, grâce à l'utilisation de plus en plus large des antirétroviraux, en décembre 2015, 30 millions de nouvelles infections à VIH-1 et 7.8 millions de décès ont pu être évités depuis 2000 (Figure 1) (ONUSIDA 2016, OMS 2016). Ces thérapies permettent désormais d'empêcher les individus infectés de transmettre le virus et retardent, voir bloquent l'apparition des symptômes. (Cohen, Chen et al. 2011).

I. 2. Origines du virus

Suite à l'identification du premier VIH, dit VIH-1, chez des individus atteints de SIDA aux Etats-Unis et en Europe (Barre-Sinoussi, Chermann et al. 1983), un second virus a été identifié comme agent étiologique du SIDA chez des patients d'Afrique de l'Ouest et baptisé VIH-2. Ce dernier est morphologiquement proche du VIH-1 mais possède un profil antigénique différent (Clavel, Guyader et al. 1986) provoquant une forme atténuée du SIDA (Campbell-Yesufu and Gandhi 2011).

Le VIH-1 et le VIH-2 sont apparentés à des lentivirus de primates appelés SIV pour *simian immunodeficiency virus*. Une grande diversité génétique est observée au sein des SIV, dont les différentes espèces sont désignées par un code faisant référence au nom commun de l'espèce d'origine, par exemple SIVgor pour gorille. L'existence de différents virus humains est due à la combinaison de plusieurs franchissements de la barrière d'espèce ayant permis la contamination de l'homme par divers virus simiens (Hahn, Shaw et al. 2000). Le VIH-2 résulte de la transmission à l'homme du SIVsm (sooty mangabey), virus infectant de manière non pathogène les mangabeys enfumés d'Afrique de l'Ouest (Santiago, Range et al. 2005) mais provoquant le SIDA chez des macaques infectés (Sharp and Hahn 2011). Quant au VIH-1, il serait le résultat de multiples transmissions et d'adaptations à l'Homme du virus de l'immunodéficience simien SIVcpz et SIVgor qui infectent naturellement les chimpanzés (*Pan troglodytes troglodytes*) et les gorilles (*Gorilla gorilla*) d'Afrique Centrale de l'ouest (Keele, Van Heuverswyn et al. 2006, Van Heuverswyn, Li et al. 2006, Sharp and Hahn 2011).

En plus de ces deux grands types de VIH, les analyses de séquences de diverses souches de VIH-1 ont permis de distinguer quatre groupes phylogénétiques : les groupes M, N, O et P. Les groupes M (*Main* ou *Major*) et N (*non-M non-O*) résultent de deux transmissions à l'homme du SIVcpz provenant du chimpanzé commun sauvage d'Afrique Centrale (Sharp and Hahn 2011).

Le groupe M, le plus répandu et qui est à l'origine de la pandémie actuelle de SIDA (Hahn, Shaw et al. 2000), est subdivisé en neuf sous-types: les sous-types A, B, C, D, F, G, H, J et K, et comprend 37 formes recombinantes entre plusieurs sous-types circulants, ces derniers sont nommés CRF pour *circulating recombinant forms* (CRF01-CRF37). Le sous-type A est subdivisé en sous-sous-types A1, A2 et plus récemment A3 et A4 (Vidal, Mulanga et al. 2006), et le sous-type F est subdivisé en sous-sous-types F1 et F2. Dans les régions d'Europe de l'Est, Amérique latine, Caraïbes et d'Amérique du Nord, le sous-type majoritaire est le sous-type B, tandis qu'il s'agit du sous-type C en Afrique sub-saharienne et en Inde, du CRF02_AG en Afrique de l'Ouest et du sous-type A en Europe de l'Est et en Asie centrale (Figure 2) (Hemelaar 2012). Le groupe P, beaucoup moins répandu, résulte de la transmission à l'homme du SIVgor provenant du gorille de plaines de l'ouest, un SIVcpz qui a évolué pour

infecter les gorilles (Sharp and Hahn 2011). Le groupe O (outlier) a causé plus de 100000 infections en Afrique de l'ouest, bien qu'il soit circonscrit dans une zone très réduite (Pepin 2013). Ce groupe a également pour origine une contamination de l'homme par le gorille (Hemelaar 2012, D'Arc, Ayouba et al. 2015).

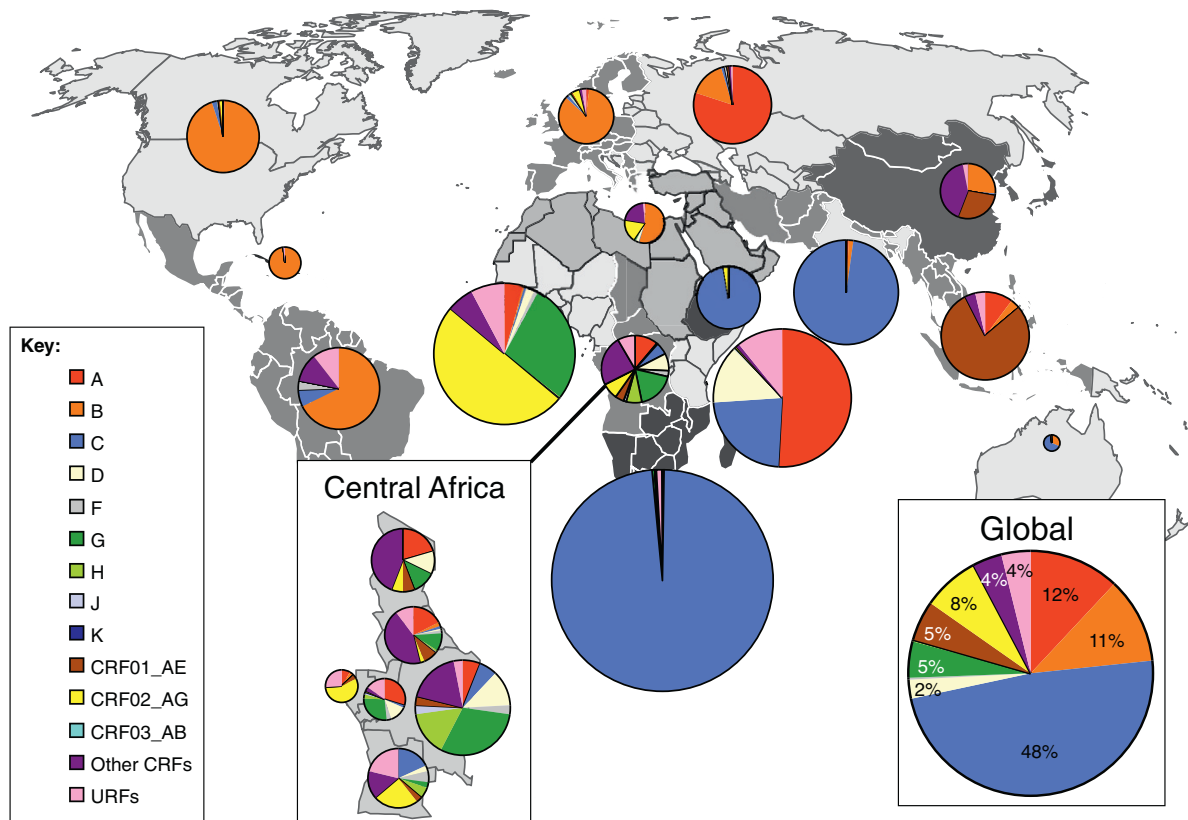


Figure 2. Répartition mondiale des sous-types de VIH-1 du groupe M et des formes circulantes recombinantes ((Hemelaar 2012), adapté de (Hemelaar, Gouws et al. 2006)). Les diagrammes en secteurs représentent la distribution des sous-types et CRF du VIH-1 de 2004 à 2007 dans chaque région. Les surfaces relatives des diagrammes en secteurs correspondent aux nombres relatifs de personnes vivant avec le VIH-1 dans les régions. Les couleurs représentent les différents sous-types et CRF du VIH-1.

On distingue un grand nombre de SIV qui continuent d'infecter les populations de singes mais qui n'ont jamais été transmis à l'homme (Sharp and Hahn 2011, Chahroudi, Bosinger et al. 2012). A ce jour, seules 39 parmi les 69 espèces de singes connues d'Afrique Subsaharienne infectées de manière endémique par une souche SIV spécifique de l'espèce ont été répertoriées (Bibollet-Ruche, Bailes et al. 2004, VandeWoude and Apetrei 2006). Une confirmation génétique a été attribuée à 32 espèces et le génome SIV complet est disponible pour 19 virus,

suggérant que bon nombre des 30 espèces de singes restantes hébergent elles aussi des virus SIV qui restent encore à décrire (Bibollet-Ruche, Bailes et al. 2004).

I. 3. Etapes de l'infection par le VIH-1

I. 3. a. Les modes de transmission de l'infection par le VIH-1

La transmission du VIH-1 se fait principalement par contact sanguin, soit par échange de différents fluides corporels comme le sperme, les sécrétions vaginales, soit de la mère à l'enfant lors de l'accouchement ou via le lait maternel. Les principales portes d'entrée sont les muqueuses (rectale, vaginale, buccale) et la voie sanguine (peau lésée, voie intraveineuse) (Shaw and Hunter 2012). Plus de 80% des infections chez les adultes surviennent après une exposition sexuelle via les voies génitales ou la muqueuse rectale ou orale (Kaul, Pettengell et al. 2008, Cohen, Shaw et al. 2011), (40% des cas chez les femmes, 70% chez les hommes). Le risque de transmission sera d'autant plus élevé que la source de contamination contient une grande quantité de virus et/ou de cellules infectées.

I – 3. b. Les stades de l'infection par le VIH-1

L'infection par le VIH-1 passe par 3 stades successifs : une primo-infection suivie d'une phase de latence clinique qui évoluera en quelques années en stade « SIDA » (Figure 3).

Phase de primo-infection: La période suivant l'entrée du virus dans l'organisme est la «primo-infection». Cette phase dure entre 2 et 5 semaines et correspond à une réplication accrue du virus dans les lymphocytes T CD4⁺ du site initial d'infection et à une dissémination massive et rapide vers divers tissus et organes (McMichael, Borrow et al. 2010, Coffin and Swanstrom 2013). Ce stade est caractérisé par un pic de charge virale dans le sang pouvant dépasser 10 millions de copies d'ARN viral/ml, et une chute de lymphocytes T CD4⁺ dans le sang (<300 cellules/ μ L) et les tissus lymphoïdes. Cette phase est souvent symptomatique. Des signes tels qu'une fièvre élevée, un syndrome pseudo-grippal ou une polyadénopathie peuvent se manifester. Puis ces symptômes disparaissent de façon spontanée (Coffin and Swanstrom 2013). A ce stade, le diagnostic est essentiel dans le but d'une prise en charge précoce et de la prévention de la transmission. En l'absence de traitement c-ART (combinaison Antiretroviral Therapy), la virémie sanguine atteint son pic après 3 à 4 semaines post-exposition et décline

spontanément pendant quelques mois avant d'atteindre un stade de stabilité (McMichael, Borrow et al. 2010).

Phase de latence clinique : Cette phase est caractérisée par un équilibre entre la réplication virale qui se stabilise et les défenses immunitaires de l'organisme, associant une réponse humorale spécifique (apparition des premiers anticorps spécifiques des protéines de VIH-1) (Fiebig, Wright et al. 2003) et une réponse cellulaire faisant intervenir les lymphocytes T CD4⁺ (Oxenius, Fidler et al. 2001, Gloster, Newton et al. 2004, Lubong Sabado, Kavanagh et al. 2009) et les lymphocytes T cytotoxiques CD8⁺ (Borrow, Lewicki et al. 1994, Pantaleo, Demarest et al. 1994, Wilson, Ogg et al. 2000).

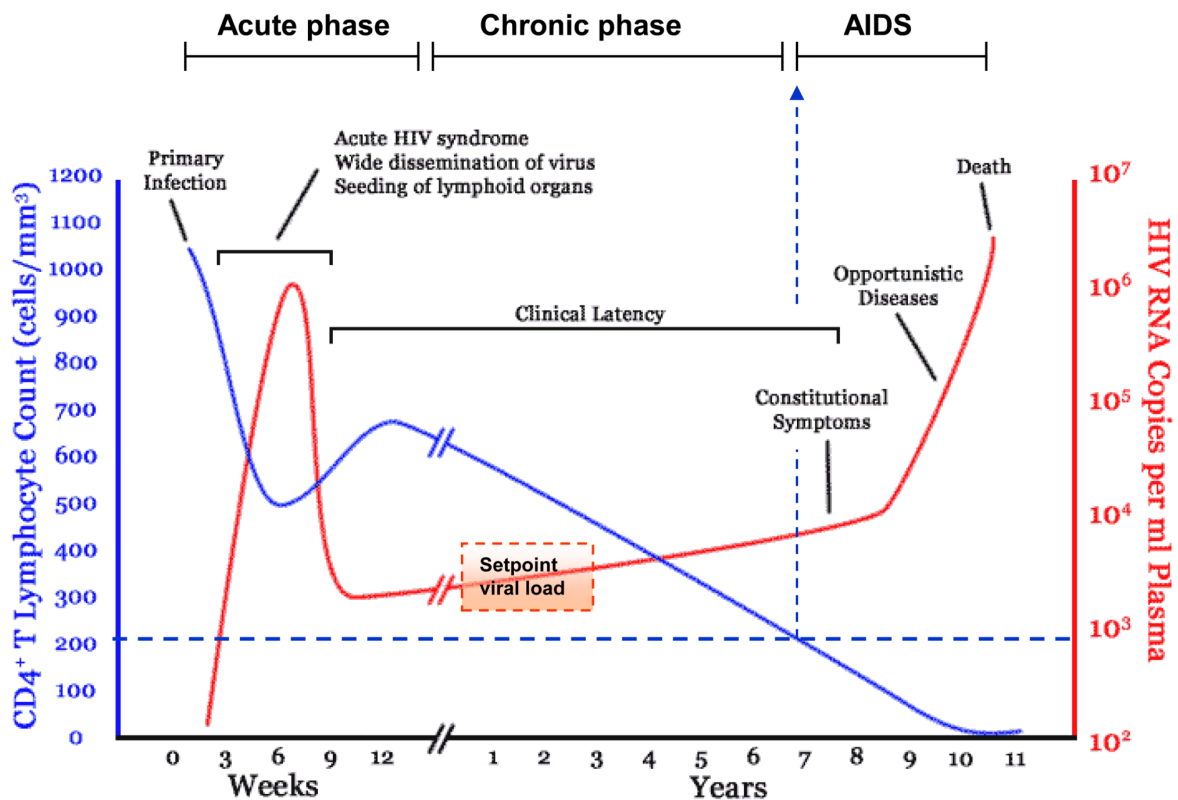


Figure 3. Cinétique de paramètres immunologiques et virologiques dans l'infection par le VIH-1 (An and Winkler 2010).

Cette phase est la plus longue de la maladie et peut durer très longtemps voir une vingtaine d'années sans manifestations cliniques. Pendant cette phase relativement stable, le virus s'adapte à la pression immunitaire par l'apparition des premières souches virales mutantes échappant à la reconnaissance par le système immunitaire et induisant à leur tour de nouvelles réponses spécifiques (Koup, Safrit et al. 1994, Price, Goulder et al. 1997, Wilson, Ogg et al. 2000). Tout au long de l'infection, alors que le virus continue de se diversifier, le système

immunitaire s'active de façon chronique et perd peu à peu ses capacités de régénération. De plus, la charge virale augmente très lentement et le taux de lymphocytes T CD4⁺ reste proche des valeurs normales. A terme, cette phase chronique se caractérise par un équilibre instable entre activation, mort et remplacement des cellules immunitaires et production/élimination des particules virales. Puis le nombre de lymphocytes T CD4⁺ dans le sang chute progressivement jusqu'à passer sous la barre des 200 cellules/ μ L, ce qui coïncide avec l'apparition de symptômes cliniques (Coffin and Swanstrom 2013).

Phase de maladie « SIDA » : En l'absence de traitement c-ART, les patients infectés par le VIH-1 évoluent majoritairement vers la phase SIDA, avec un taux de mortalité supérieur à 95%. Cette phase est marquée par la destruction des organes lymphoïdes, associée à une déplétion profonde de l'immunité cellulaire signant une profonde immunodépression (Coffin and Swanstrom 2013). A ce stade d'irréversibilité, surviennent des infections opportunistes (pneumocystose, toxoplasmose, infections à mycobactéries, atteintes viscérales par le cytomégalovirus, etc) et/ou des maladies cancéreuses (lymphomes malins non Hodgkiniens, sarcomes de Kaposi, etc).

I. 3. c. La dissémination du virus

Après contamination par voie muqueuse, le VIH-1 va se disséminer et rentre en phase d'éclipse qui dure une à deux semaines, au cours de laquelle le virus n'est pas encore détectable dans le plasma sanguin (Lee, Giorgi et al. 2009). Le virus se dissémine dans les différents organes contenant des cellules cibles via les cellules dendritiques (DCs) et les macrophages dans lesquels sont accumulés des vacuoles de particules virales infectieuses (Sharova, Swingler et al. 2005), ce qui permet le transfert du virus vers les lymphocytes T CD4⁺ cibles par le biais de synapses virologiques, qui à leur tour, vont migrer vers les ganglions proximaux (Lore, Smed-Sorensen et al. 2005, Russell, Martin et al. 2013). Les DCs infectées sont retrouvées dans les 24 heures post-contamination dans les ganglions lymphatiques drainants (Hu, Gardner et al. 2000). Les principaux organes infectés sont les organes lymphoïdes secondaires, dont les tissus lymphoïdes associés à la muqueuse du tube digestif (GALT, *gut-associated lymphoid tissues*), les tissus lymphoïdes pulmonaires, les ganglions et la rate, hébergeant 98% des lymphocytes T CD4⁺. Les organes lymphoïdes primaires tels que la moelle osseuse et le thymus, et les organes tels que le système nerveux central, le tractus génital et le foie, qui

représentent des lieux de résidence des différentes cellules immunitaires, sont eux aussi rapidement infectés par le virus (Haase 1999, Lackner and Veazey 2007). La dissémination du VIH-1 aux organes lymphoïdes secondaires est rapide (Ribeiro Dos Santos, Rancez et al. 2011) et associée à une réplication virale accrue et exponentielle en deux à quatre semaines (Lafeuillade, Poggi et al. 1997, Lackner and Veazey 2007).

I. 4. VIH-1: Structure et diversité du virus

I. 4. a. L'organisation des particules virales

Le VIH-1 est un virus enveloppé de la famille des *Retroviridae*, appartenant à la sous-famille des lentivirus, d'une centaine de nanomètres de diamètre dont la capside renferme un génome diploïde qui se présente sous la forme de deux copies d'ARN simple brin de polarité positive (Sharp, Bailes et al. 2001, Kuznetsov, Victoria et al. 2003). Au cours du cycle de réplication des rétrovirus, l'ARN est rétro-transcrit en ADN viral par une transcriptase inverse du virus (Hu and Hughes 2012).

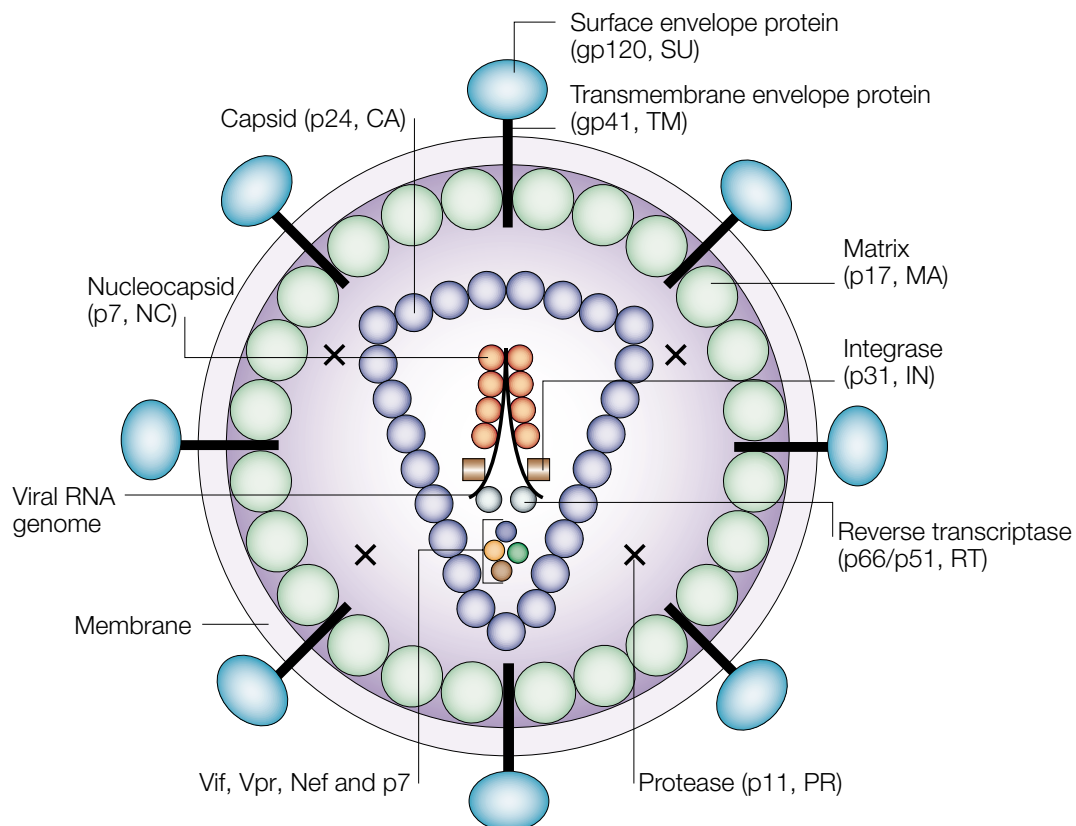


Figure 4. Organisation des particules rétrovirales (Robinson 2002).

La particule virale est délimitée par une membrane lipidique provenant de la membrane plasmique de la cellule productrice, au niveau de laquelle sont localisées les glycoprotéines d'enveloppe transmembranaire gp41 et de surface gp120 (Scarlata and Carter 2003). Au sein de la particule, la protéine de matrice (MA) tapisse la surface interne de cette enveloppe lipidique, suivie de la protéine de capsid (CA) virale qui vient former une seconde structure sous-jacente, de forme trapézoïdale caractéristique. Cette dernière contient les deux brins d'ARN viraux enroulés dans la nucléocapside (NC), des enzymes virales, notamment la protéase (PR), la transcriptase inverse (RT) et l'intégrase (IN), en plus de certaines protéines virales dites accessoires et de composés nécessaires à la transcription inverse du génome viral (Figure 4) (Scarlata and Carter 2003, Karlsson Hedestam, Fouchier et al. 2008)

I. 4. b. L'organisation du génome viral

Le génome du VIH-1 possède 9 cadres ouverts de lectures répartis sur un peu moins de 10kb d'acides nucléiques. Il code pour 3 grands types de protéines : les protéines de structure, les protéines régulatrices et les protéines accessoires (Figure 5) (Greene and Peterlin 2002).

Les protéines de structure sont codées par trois cadres ouverts de lecture : Gag, Pol et Env. Gag (Group Antigen Specific) est clivé en protéines de matrice, de capsid et de nucléocapsid (MA, CA et NC précédemment évoquées). Pol (Polymérase) est traduit sous la forme d'une polyprotéine Gag-Pol, et code pour les enzymes virales impliquées dans la transcription inverse du génome viral (Transcriptase inverse, RT), son intégration dans le génome cellulaire (Intégrase, IN) et la maturation des particules virales (Protéase, PR). Enfin, le précurseur Env (Envelop) est clivé en gp120 et gp41 (Freed 2015).

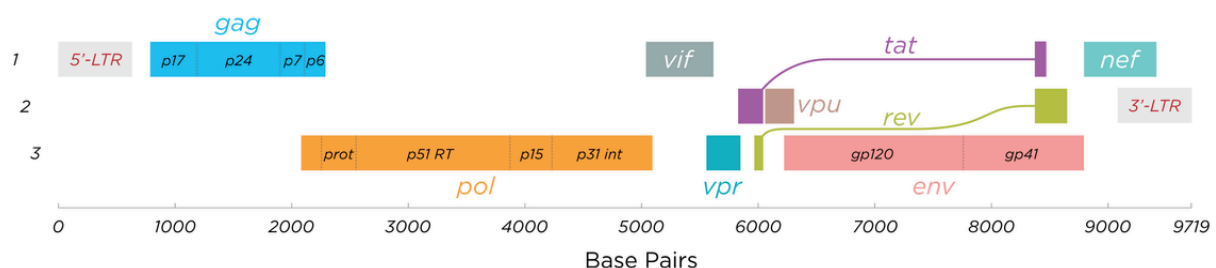


Figure 5. Représentation du génome du VIH-1 (https://en.wikipedia.org/wiki/Structure_and_genome_of_HIV).

La protéine régulatrice du VIH-1 Rev (Regulator of virion Protein Expression) est impliquée dans l'export des ARNm viraux tandis que Tat (Trans-Activator of Transcription) permet

d'induire la transcription du génome viral (Scarlata and Carter 2003). Les protéines du VIH-1 Vif, Vpr et Vpu ont été qualifiées d'accessoires car elles ne sont pas nécessaires pour la réplication virale mais elles jouent en réalité un rôle fondamental dans la pathogenèse en favorisant l'infection des cellules hôtes, notamment en contrecarrant l'activité des facteurs de restriction (Altfeld and Gale 2015, Jia, Zhao et al. 2015, Simon, Bloch et al. 2015), et la dissémination du virus vers d'autres cellules cibles (Greene and Peterlin 2002). Ces protéines accessoires diffèrent selon le lentivirus et représentent des marqueurs décrivant l'histoire évolutive des souches virales. L'organisation des génomes de l'ensemble des VIS et VIH révèle que l'ensemble des virus de l'immunodéficience codent pour trois protéines accessoires communes : Vif, Vpr et Nef. Le VIH-2 et les SIV qui lui sont apparentés (VIS_{SM} et VIS_{MAC}) codent en plus pour la protéine Vpx (développée plus loin) tandis que VIH-1 et les VIS qui lui sont apparentés (VIS_{CPZ} et VIS_{GOR}) codent pour la protéine Vpu.

I. 4. c. Les cibles cellulaires du VIH-1

L'infection par le VIH-1 est une infection chronique caractérisée par l'élimination drastique des lymphocytes T CD4⁺ circulants (LT CD4⁺) associée à une intense charge virale dans l'organisme, signant un épuisement profond du système immunitaire avec perte de ses capacités de régénération (Rowland-Jones 2003, Coffin and Swanstrom 2013). La déplétion des LT CD4⁺ est très vite devenue le principal marqueur de la progression de la maladie et de l'immunodépression liée au VIH-1. Lorsque le nombre absolu de LT CD4⁺ du sang périphérique baisse en dessous d'un seuil de 200 LT par mm³, l'individu devient vulnérable à de multiples infections opportunistes (Rowland-Jones 2003).

La capacité du virus à cibler particulièrement les LT CD4⁺ s'explique par l'expression à leur surface du récepteur à forte affinité pour le virus: la glycoprotéine CD4 (Dalglish, Beverley et al. 1984, Klatzmann, Champagne et al. 1984, Zhu, Liu et al. 2006), en combinaison avec un corécepteur: CXCR4 (C-X-C motif Chemokine receptor type 4) ou CCR5 (C-C motif chemokine receptor type 5) (Wilens, Tilton et al. 2012) comme détaillé ci-dessous. Les macrophages et les DCs expriment eux aussi la molécule CD4 et les corécepteurs à l'infection, et constituent des cibles du VIH-1 (Dalglish, Beverley et al. 1984, Popov, Chenine et al. 2005, Coleman and Wu 2009, Shen, Richter et al. 2009).

I. 4. d. Le cycle de vie du virus

La durée moyenne d'un cycle de réplication virale est estimée à 2 jours dans le pool de lymphocytes T CD4⁺ à réplication active (Perelson, Neumann et al. 1996). L'entrée du VIH-1 dans la cellule cible est médiée par l'interaction entre la protéine d'enveloppe gp120 et la glycoprotéine CD4 exprimée à la surface des cellules cibles. La reconnaissance d'un des corécepteurs aux chimiokines CCR5 ou CXCR4 par la gp120 est également nécessaire pour une fusion complète de la membrane virale avec la membrane plasmique de la cellule (Klasse 2012). Les cibles cellulaires potentielles du VIH-1 expriment donc pour la plupart la glycoprotéine CD4 en combinaison avec CCR5 et/ou CXCR4, comme décrit précédemment.

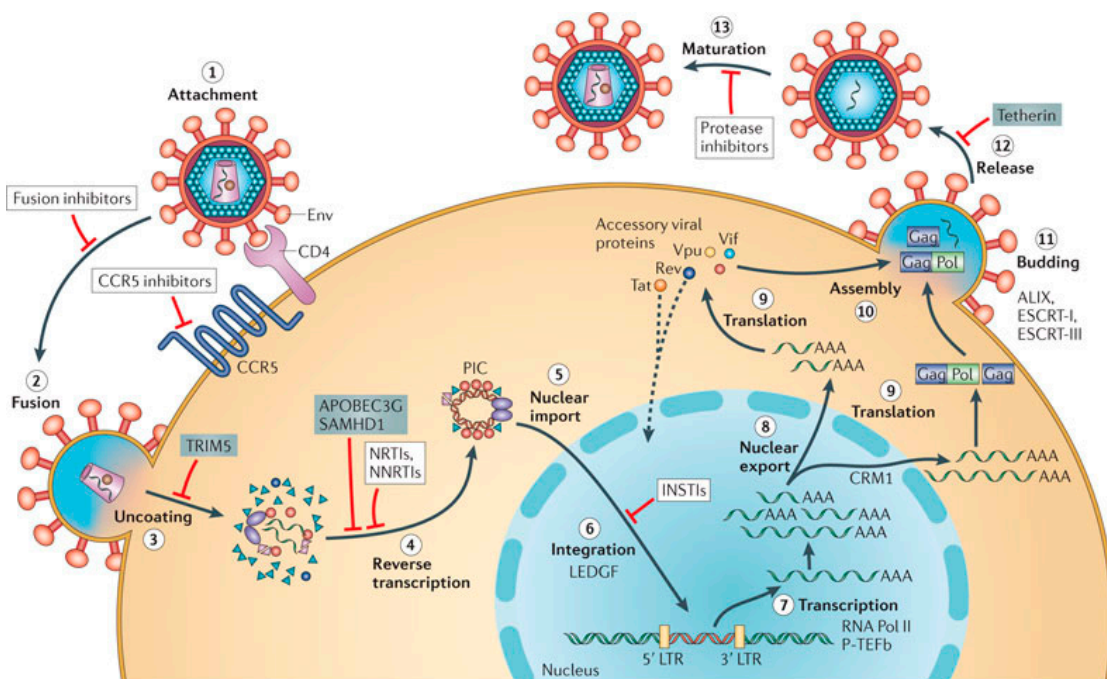


Figure 6. Cycle de vie du VIH-1 dans une cellule hôte (Musumeci, Riccardi et al. 2015).

Après fusion des membranes, la capsid est démantelée et le génome viral est libéré dans le cytoplasme avant d'être rétrotranscrit en ADN complémentaire (ADNc) par la transcriptase inverse du virus (Klasse 2012). Ce double brin d'ADN possède à ses extrémités des séquences répétées terminales appelées « Long Terminal Repeat » (LTR) (Fassati and Goff 2001). Les étapes susmentionnées vont permettre la mise en place d'un Complexe de Pré-intégration (PIC) contenant l'ADNc, appelé provirus, afin d'être transloqué dans le noyau (Marini, Kertesz-Farkas et al. 2015). Cependant, cette étape d'intégration ne concerne qu'une minorité

de l'ADN viral. En effet, une grande majorité de l'ADN viral reste dans le noyau sous forme non intégrée (circulaire ou linéaire) en particulier sous forme d'ADN viral circulaire à 1 ou 2 LTR. Ces formes virales sont considérées comme une voie sans issue du cycle de réplication et représentent des sous-produits du processus d'intégration se trouvant exclusivement dans le noyau (Sharkey, Teo et al. 2000, Sloan and Wainberg 2011).

Une fois le provirus importé dans le noyau, l'intégrase virale permet l'insertion de l'ADN viral linéaire dans le génome de la cellule hôte, le plus souvent au niveau d'introns de gènes activement transcrits (Han, Lassen et al. 2004, Craigie and Bushman 2012).

L'intégrase représente une cible thérapeutique majeure (Dubey, Satyanarayana et al. 2007) car les mécanismes moléculaires impliqués dans cette étape du cycle viral sont connus (Craigie 2001, Delelis, Carayon et al. 2008). Ainsi, l'intégration du provirus dans le génome cellulaire lui confère une protection de toute attaque par le système immunitaire, celui-ci se réplique en même temps que l'ADN cellulaire. En effet, l'ADN proviral représente la forme la plus stable de l'ADN VIH-1 qui demeure indéfiniment dans le génome de la cellule hôte et qui sert de matrice pour la transcription virale (Krishnan and Engelman 2012).

La transcription virale est dépendante de l'état d'activation des cellules car l'accès des facteurs de transcription virale au site d'initiation de la transcription est limité dans les cellules quiescentes du fait de la structure compactée de la chromatine. Lors de l'activation, le provirus est transcrit par des facteurs cellulaires en ARN viraux pour être exportés hors du noyau puis traduits dans le cytoplasme pour donner les différentes protéines virales nécessaires à l'assemblage de la particule virale. Cette particule virale s'enveloppe en utilisant les composants de la membrane cellulaire et ses propres glycoprotéines de surface puis bourgeonne afin d'être relarguée hors de la cellule (Lehmann-Che and Saib 2004). Ce bourgeonnement permet la formation de particules virales immatures qui ne deviendront infectieuses qu'après clivage des précurseurs Gag et Gag-Pol par la protéase virale (Sundquist and Krausslich 2012). Le cycle viral est représenté en figure 6.

I. 4. e. La diversité virale et la notion de compartimentation

Le VIH-1 présente une grande diversité virale génétique et antigénique qui s'exprime également en intra-individuel. La mutation et la recombinaison sont les principaux mécanismes à la base de la diversité génétique et de l'évolution de la pandémie du VIH-1 (Najera, Delgado et al. 2002, Thomson and Najera 2005). Chez un individu infecté, les millions de copies virales qui circulent présentent des séquences variables : le cycle réplcatif du VIH-1 nécessite le recours à une transcriptase inverse - ARN viral rétro-transcrit en ADN viral - dont l'absence d'activité exonucléasique - activité de relecture - engendre de nombreuses erreurs de transcription. En effet, la transcriptase inverse n'a pas d'activité régulatrice pour la 3'-exonucléase et ne peut donc pas garantir que l'ADN transcrit est une copie fidèle de l'ARN (Perelson, Neumann et al. 1996). On estime environ une erreur sur 10 000 nucléotides transcrits, soit 0,2 à 2 mutations par génome par cycle réplcatif (Domingo 1998, Korber, Gaschen et al. 2001). Ce taux de mutations est à mettre en rapport avec la dynamique de réplication du virus : chaque jour, environs dix milliards de particules virales sont produites, entraînant l'accumulation de très nombreuses mutations et de séquences virales génétiquement différentes (Figure 7).

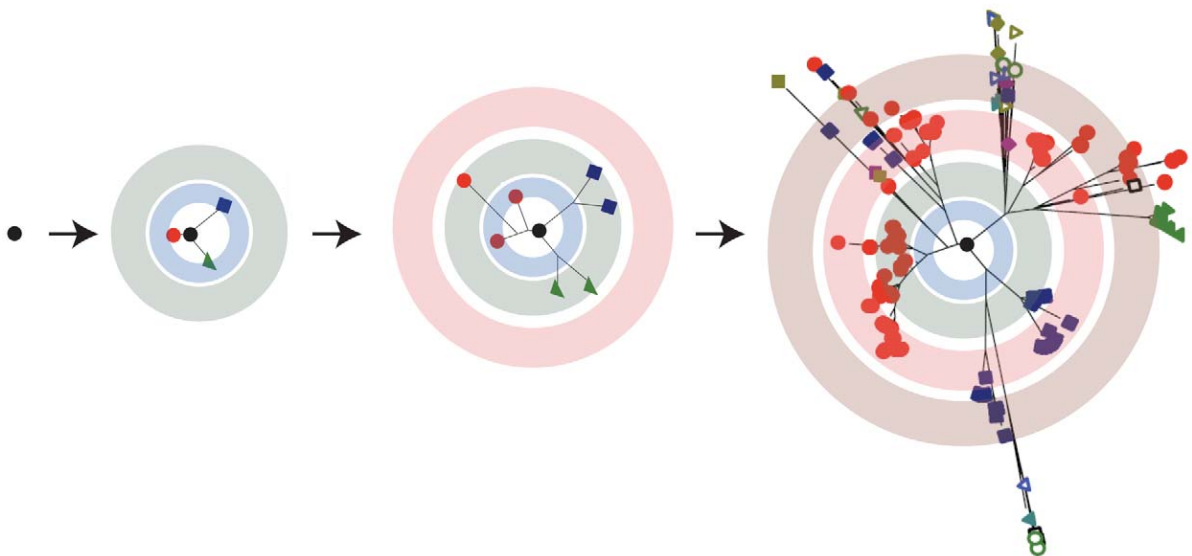


Figure 7. VIH-1 et quasi-espèce virale (Lauring and Andino 2010). Du fait des erreurs de transcription répétées et de l'intensité de la réplication virale, les séquences génétiques des virions produits évoluent avec le temps et la population virale globale devient de plus en plus hétérogène chez un même individu.

Chez un même individu, l'ensemble de ses séquences constitue une population virale qualifiée de « quasi-espèce virale » comportant un variant majoritaire largement représenté, et de multiples variants minoritaires (Lauring and Andino 2010). La quasi-espèce évolue aussi selon les pressions thérapeutiques et immunitaires exercées. La variabilité virale est différente selon les régions du génome, qui sont en général plus ou moins conservées. La séquence qui code pour la gp120 –glycoprotéine d'enveloppe– est une région très variable. Ce polymorphisme est un moyen d'échappement du virus au système immunitaire. La boucle V3 est une zone hypervariable au sein de la gp120 qui joue un rôle dans la fixation du virus à son récepteur. Son étude permet l'analyse de la variabilité des quasi-espèces chez un même individu, mais également entre individus (Morris, Marsden et al. 1999).

De nos jours, la réplication virale peut être contrôlée par l'utilisation de traitements c-ART. Une charge virale plasmatique indétectable signe ce contrôle mais ne permet en aucun cas l'éradication du VIH-1 dans l'organisme (Richman, Margolis et al. 2009, International, Deeks et al. 2012). En effet, dès lors que la pression thérapeutique est levée (en cas d'interruption du traitement), le « rebond viral » est systématique et rapide (Davey, Bhat et al. 1999, Pinkevych, Cromer et al. 2015, Li, Etemad et al. 2016). Ce rebond de charge virale est la preuve incontestable de la persistance du virus et de la mise en place d'un réservoir pour le VIH-1 malgré les traitements c-ART (Kulpa and Chomont 2015). Dès les premières semaines de l'infection par le VIH-1, le génome viral s'intègre dans le génome de cellules dites « réservoirs » : les lymphocytes T CD4 mémoires quiescents, à demi-vie longue, permettent la persistance virale à très long terme. Par ailleurs, les réservoirs sont des cellules ou des sites anatomiques où le VIH-1 ou des cellules infectées par le VIH-1 survivent car la cinétique virale est plus lente que celle du sang périphérique. Ces réservoirs viraux protègent le VIH-1 des réactions immunitaires spécifiques et du traitement c-ART créant ainsi un environnement propice à la persistance virale (North, Higgins et al. 2010, Karris and Smith 2011).

Des études ont pu montrer au cours du temps, une stabilité des séquences virales intégrées dans le génome des cellules réservoirs, autrement dit, l'absence d'évolution génétique et donc de diversité nouvellement créée, y compris après de nombreuses années de contrôle de la virémie par les antirétroviraux (Josefsson, von Stockenstrom et al. 2013, Kearney, Wiegand et al. 2016). Par ailleurs, lorsque le génome du VIH-1 acquiert des mutations de résistance aux molécules antirétrovirales, en cas d'observance imparfaite par exemple, les séquences mutées

s'intègrent pareillement aux génomes des cellules réservoirs : il s'agit des « mutations archivées » dont la présence empêche le recyclage futur des traitements dont l'efficacité est affectée par ces mutations. L'établissement d'un tel réservoir a jusqu'à présent mis en défaut toutes les stratégies dites d'éradication virale mais constitue à l'heure actuelle un axe majeur et prometteur de recherche. Dans ce contexte, un consortium s'est mis en place avec un programme de « HIV CURE » dans le but d'éradiquer le réservoir VIH-1 (Deeks, Lewin et al. 2016).

Le sang périphérique permet l'étude de la dynamique de l'infection par le VIH-1 (mesure de la charge virale plasmatique ou de l'ADN viral) mais il ne la reflète que partiellement. En effet, la réplication du virus n'est pas homogène dans tout l'organisme : on parle alors de compartimentation. Certains organes, tels que le système nerveux central (SNC), le tractus génital et le tissu lymphoïde gastro-intestinal, constituent les compartiments anatomiques, et de ce fait, virologiques qui permettent au VIH-1 de persister malgré le traitement c-ART. Les compartiments sont définis comme des régions anatomiques qui restreignent le flux génétique du VIH-1, permettant ainsi l'évolution virale et la divergence par rapport au virus circulant dans le sang périphérique (North, Higgins et al. 2010, Karris and Smith 2011). Plusieurs études ont montré des différences entre les séquences de VIH-1 de différents compartiments (différentes quasi-espèces virales), tels que le sang, le SNC, le tractus génital, la rate, les ganglions lymphatiques, les poumons, les reins et d'autres tissus (Epstein, Kuiken et al. 1991, Haggerty and Stevenson 1991, Hughes, Bell et al. 1997, Marras, Bruggeman et al. 2002), ainsi que de sous-compartiments d'un tissu donné, tels que la pulpe blanche et la pulpe rouge de la rate (Gratton, Cheynier et al. 2000) ou du lobe frontal, des ganglions de la base et du lobe temporal médian du cerveau (Shapshak, Segal et al. 1999). Les quasi-espèces virales de ces divers compartiments peuvent différer entre elles par leur tropisme cellulaire, leur diversité et leurs résistances aux traitements c-ART (Si-Mohamed, Kazatchkine et al. 2000, Zhang, Rowe et al. 2002, Pillai, Pond et al. 2006).

Le SNC constitue un réservoir important du VIH-1 (Haggerty and Stevenson 1991, Zarate, Pond et al. 2007, Karris and Smith 2011) au sein duquel les macrophages péri-vasculaires et la microglie constituent la principale source d'infection (Koenig, Gendelman et al. 1986, Price 2000, Tyler and McArthur 2002). Les études montrent des séquences virales différentes dans le liquide céphalo-rachidien (LCR) et dans le sang d'un même patient, présentant des

mutations de résistance différentes, avec des cinétiques de réplication différentes, très en faveur d'une compartimentation (Harrington, Schnell et al. 2009, Chaillon, Gianella et al. 2014).

Les caractéristiques immunologiques spécifiques du SNC, l'existence d'une barrière anatomique entre le sang et le LCR: la barrière hémato-encéphalique (BHE), la mutation et la recombinaison rapides du VIH-1 et la faible pénétration des traitements c-ART dans le SNC jouent probablement un rôle important dans cette compartimentation du VIH-1 dans le SNC. Plusieurs caractéristiques constitutionnelles spécifiques au SNC appuient l'hypothèse selon laquelle le SNC est un site immunologiquement privilégié. En effet, la BHE est composée de cellules endothéliales qui limitent sélectivement le passage des composants cellulaires et des macromolécules de la circulation systémique au système nerveux central. Les cellules du système nerveux central expriment rarement des protéines aux propriétés immunologiques, telles que les CMH (complexe majeur d'histocompatibilité) de classe I et II. De plus, le système nerveux central est dépourvu de système lymphatique (Kreutzberg 1996, Shrikant and Benveniste 1996, Sedgwick, Ford et al. 1998).

Des pressions thérapeutiques différentes dans les deux compartiments du sang et du SNC pourraient expliquer l'émergence de profils de résistance différents. En effet, une suppression incomplète du virus dans le SNC, provoquée par des facteurs tels que l'absence ou l'insuffisance de diffusion des traitements c-ART dans le SNC, peut favoriser les mutations virales et la résistance aux médicaments antirétroviraux.

Le tractus génital masculin est anatomiquement isolé du sang par la barrière hémato-testiculaire, ce qui confère au sperme un microenvironnement spécifique avec des particularités immunologiques, virologiques et pharmacologiques. Le sperme est constitué d'une fraction liquidienne (le liquide séminal) et d'une fraction cellulaire composée de spermatozoïdes et de cellules rondes du sperme (NSC pour *non-spermatozoal cells*), principalement représentée par des leucocytes : lymphocytes et macrophages. Dans le sperme, le réservoir viral est constitué par les NSC (Quayle, Xu et al. 1997, Nunnari, Otero et al. 2002) et comme dans le sang, une pression antirétrovirale adaptée permet d'inhiber la réplication virale dans le sperme (Leruez-Ville, Dulioust et al. 2002), mais toute inobservance thérapeutique se solde par un rebond virologique (Choudhury, Pillay et al. 2002, Liuzzi,

D'Offizi et al. 2003, Costiniuk, Kovacs et al. 2013) et l'émergence de souches résistantes aux traitements c-ART. Plusieurs études comparatives de séquences virales issues du sang et du sperme ont permis l'isolement de quasi-espèces virales phylogénétiquement distinctes du sperme et du sang, et révélé une compartimentation du virus entre ces deux compartiments (Figure 8) (Zhu, Wang et al. 1996, Byrn and Kiessling 1998, Kiessling, Fitzgerald et al. 1998, Chaillon, Gianella et al. 2014).

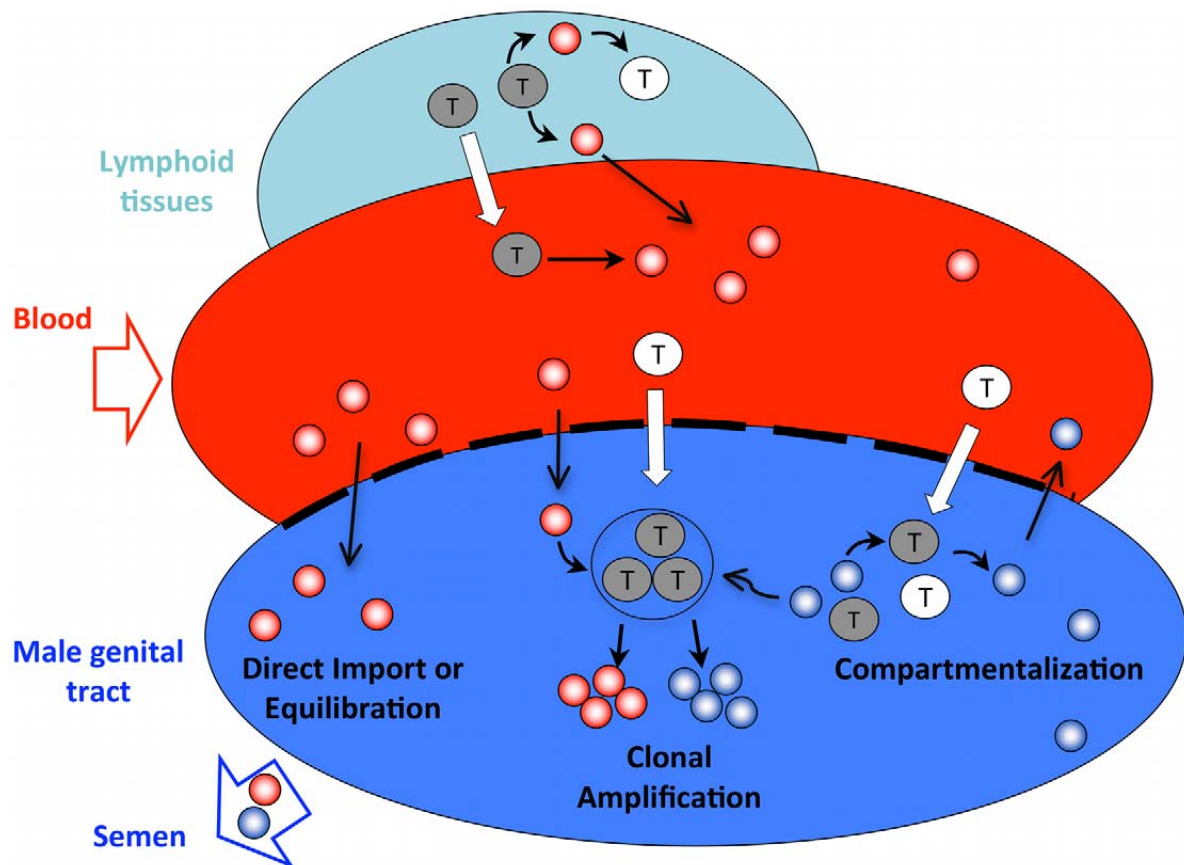


Figure 8. Populations de VIH-1 dans le sang et le tractus génital masculin (Anderson, Ping et al. 2010). Il existerait une diffusion passive des virions du plasma sanguin (ronds rouges) vers le liquide séminal, du fait d'une barrière hémato-testiculaire semi-perméable (en pointillés noirs). Ces virions pourraient infecter les cellules-cibles du sperme (NSC), provoquant la production par amplification clonale de nouveaux virions, eux-mêmes infectants de nouvelles cellules. Cette réplication dans le sperme pourrait ainsi s'autonomiser et créer un véritable compartiment virologique, avec l'émergence de quasi-espèces virales (ronds bleus) génétiquement différentes de celles du sang.

Les virus isolés du sang et du sperme ne présentent pas toujours les mêmes mutations de résistance (Mayer, Boswell et al. 1999, Eyre, Zheng et al. 2000, Ghosn, Viard et al. 2004, Liuzzi, Chirianni et al. 2004), en rapport avec une diffusion des antirétroviraux qui s'effectue de manière différente dans les deux compartiments, du fait des paramètres pharmacologiques qui diffèrent d'une molécule à une autre (Taylor and Pereira 2001, Chan 2005).

Les quasi-espèces de VIH-1 retrouvées dans le sperme proviendraient de deux mécanismes distincts : une réplication autonome à partir des NSC indépendante de la réplication dans le sang, et une diffusion passive des souches virales du plasma sanguin vers le liquide séminal (Anderson, Ping et al. 2010).

Par ailleurs, des études ont montré que le VIH-1 pouvait également être détecté dans le tractus génital féminin malgré une charge virale indétectable dans le sang périphérique (sous-c-ART) (Kovacs, Wasserman et al. 2001, Chomont, Hocini et al. 2007), et que les séquences virales isolées de ces deux compartiments présentaient des différences dans les mutations de résistance. De plus, l'étude comparative de séquences virales issues d'échantillons de lavage cervico-vaginaux ont permis l'isolement de quasi-espèces virales présentant des caractéristiques génétiquement distinctes par rapport aux virus isolés des sections endocervicales (De Pasquale, Leigh Brown et al. 2003).

Au sein du compartiment sanguin, il y a peu de données disponibles concernant la variation génétique et la distribution cellulaire des quasi-espèces du VIH-1 dans les sous-populations cellulaires sanguines. L'infection préférentielle médiée par le tropisme à l'un des corécepteurs du VIH-1 et la réplication virale dans les cellules cibles peuvent influencer la distribution des populations virales dans les réservoirs cellulaires. Les différences de pressions exercées par les traitements c-ART et le système immunitaire de l'hôte d'un type de cellules ou de tissus à un autre peuvent également influencer sur la diversité génétique du virus dans un compartiment cellulaire donné.

En plus de la compartimentation anatomique, des études ont montré l'existence de compartimentation entre différentes sous-populations cellulaires. Les résultats de ces études montrent des séquences virales différentes entre ces sous-populations cellulaires, notamment : entre les monocytes, les lymphocytes T CD4⁺ (Fulcher, Hwangbo et al. 2004) et les lymphocytes T CD8⁺ du sang (Potter, Lemey et al. 2004), mais également entre les monocytes et les lymphocytes T CD4⁺ naïfs et mémoires (Delobel, Sandres-Saune et al. 2005). En effet, les analyses phylogénétiques ont montré que ces diverses sous-populations cellulaires hébergeaient des quasi-espèces de VIH-1 génétiquement distinctes. Les mutations de résistance aux traitements c-ART étaient également distribuées différemment d'une sous-population cellulaire à l'autre suggérant un trafic minimal du virus entre les sous-populations

cellulaires sanguines au cours du traitement c-ART.

Les résultats du groupe de June Myung Kim, *et al.* ont apporté des clarifications quant à la dynamique du virus au sein des sous-populations cellulaires dans le sang et ont défini les populations d'ARNs du VIH-1 en circulation dans le plasma sanguin en tant que source du provirus des différentes sous-populations cellulaires. En effet, avant initiation du traitement c-ART, il a été montré que les ARNs du VIH-1 dans le plasma sanguin contribuaient à l'établissement de populations d'ADN du VIH-1 dans les lymphocytes T CD4⁺ naïfs, mémoires centrales, mémoires effecteurs, les lymphocytes T CD4⁺ activés et les cellules NK (Natural Killer), à l'exception des monocytes. Les événements de migration virale identifiés suggèrent que les lymphocytes T CD4⁺ activés, mémoires centrales et mémoires effecteurs sont la principale source de populations d'ARN du VIH-1 en circulation dans le plasma sanguin, tandis que la seule observation d'évènements de migration virale du plasma sanguin vers les cellules NK, les monocytes, et les lymphocytes T CD4⁺ naïfs suggère que ces cellules pourraient être considérées comme des «puits» viraux et probablement pas comme des sources majeures de populations d'ARNs VIH-1 en circulation (Choi, Chaillon et al. 2016). À ce jour, la compartimentation du VIH-1 au sein d'une même sous-population cellulaire n'a pas encore été décrite.

I. 5. Répercussions de l'infection sur le système immunitaire

I. 5. a. L'élimination des lymphocytes T CD4⁺

La période suivant la transmission du virus, le plus souvent par voie muqueuse (Cohen, Shaw et al. 2011), correspond à une réplication accrue et libre du VIH-1 dans les lymphocytes T CD4⁺ activés du site initial d'infection (Johnston and Fauci 2007). Il s'en suit une élimination des lymphocytes T CD4⁺ présents localement (McKinnon, Nyanga et al. 2015) et une dissémination massive et rapide du virus dans l'organisme, notamment, vers les ganglions lymphatiques drainants. Une fois que le virus a atteint ces derniers, il se dissémine via le système lymphatique, vers la circulation sanguine générale et colonise tous les tissus, dont le tractus gastro-intestinal, les ganglions lymphatiques, le cerveau et la rate (Kahn and Walker 1998, Thompson, Cherry et al. 2011).

L'infection des lymphocytes T CD4⁺ peut aussi résulter d'un transfert de particules virales via une synapse infectieuse, depuis une DC porteuse du virus mais non infectée, par interaction des virions présentés par la DC et les récepteurs et corécepteurs du VIH-1 des lymphocytes T CD4⁺. Le VIH-1 est ensuite libéré par exocytose de virions ou directement par bourgeonnement de virions nouvellement synthétisés (Geijtenbeek, Kwon et al. 2000). Par ailleurs, les transferts de virions peuvent également avoir lieu depuis des DC ou des lymphocytes infectés (Jolly and Sattentau 2004), on parle alors de synapses virologiques (Jolly and Sattentau 2007).

Différents mécanismes ont été incriminés dans le phénomène de déplétion des lymphocytes T CD4⁺. Les cellules directement infectées par le VIH-1 peuvent mourir de l'effet cytopathique du virus (Guihot, Bourgarit et al. 2011) ou être éliminées suite aux réponses immunitaires effectrices : lysées par les réponses cytotoxiques (CTL, Cytotoxic T Lymphocyte) des lymphocytes T CD8⁺ spécifiques du VIH-1 (Cheynier, Henrichwark et al. 1994) ou par des cellules NK (Vieillard, Strominger et al. 2005). De plus, d'autres mécanismes indirects tels que l'apoptose résultant de l'activation prolongée des lymphocytes T CD4⁺ non infectés par le VIH-1 (AICD, activation-induced cell death) et l'induction de la sénescence, contribuent aussi à la déplétion des cellules T CD4⁺ (Gougeon and Montagnier 1999, Appay and Sauce 2008, Fevrier, Dorgham et al. 2011, Cooper, Garcia et al. 2013, Okoye and Picker 2013). La dissémination du virus de cellule-à-cellule est 102 à 103 fois plus efficace que les particules virales libres émanant de ces mêmes cellules (Jolly 2011) et influe fortement sur l'issue de l'infection par le VIH-1.

Les ganglions lymphatiques représentent l'un des principaux sites d'élimination des lymphocytes LT CD4⁺ (Zeng, Haase et al. 2012). Si le VIH-1 infecte une cellule activée, et donc permissive (c'est-à-dire 5% du nombre total de cellules T CD4⁺), une infection productive s'ensuit puis la cellule meurt d'une apoptose médiée par la caspase-3. Inversement, si la dissémination du VIH-1 se produit de cellule-à-cellule via une synapse virologique vers une cellule quiescente, donc non permissive (c'est-à-dire >95% des cellules T CD4⁺ cibles), une infection abortive se produit, ce qui entraîne l'accumulation de particules d'ADN virales cytosoliques induisant l'activation de la caspase-1, ce qui déclenche à son tour la pyroptose, une forme hautement inflammatoire de mort cellulaire programmée (Jolly, Kashefi et al. 2004, Jolly, Mitar et al. 2007, Galloway, Doitsh et al. 2015). L'élicitation de la pyroptose nécessite

absolument une transmission du VIH-1 de cellule-à-cellule. En effet, les virions du VIH-1 sans cellules, même en grande quantité, ne sont pas capables de déclencher la mort cellulaire pyroptotique (Figure 9).

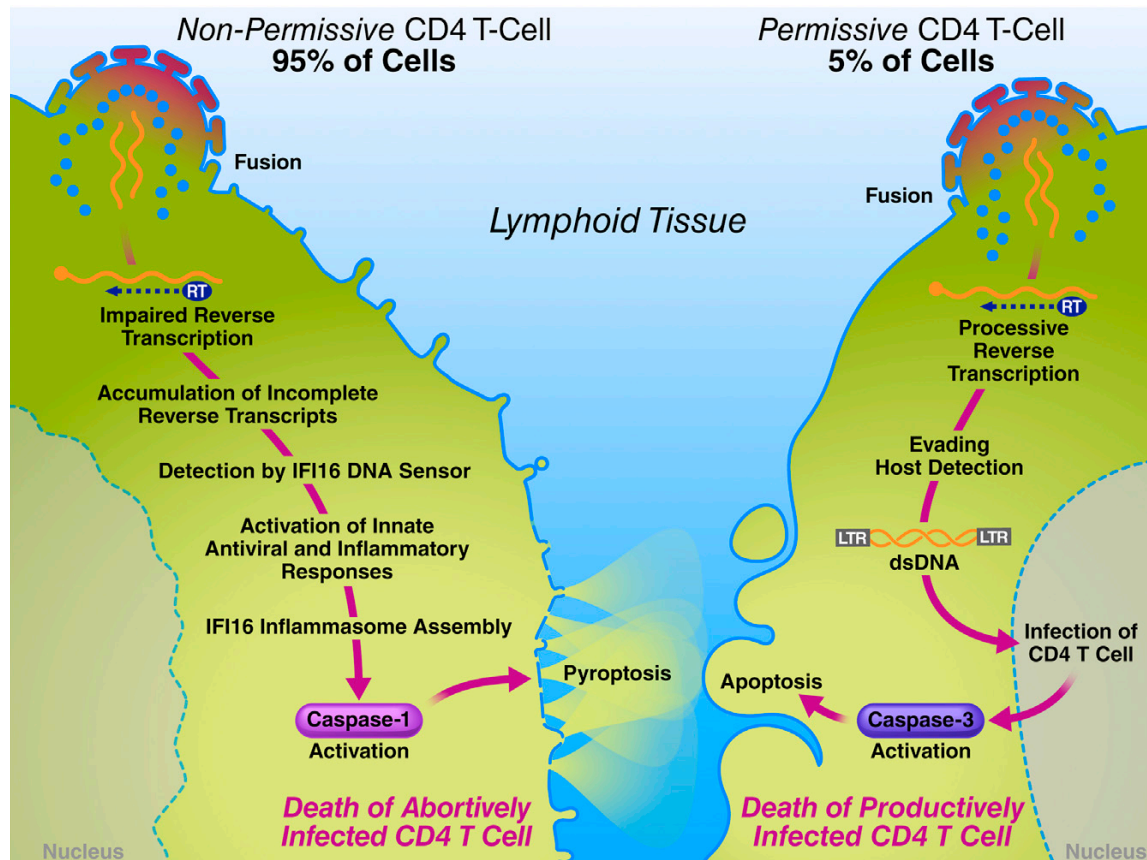


Figure 9. Rôles de l'apoptose dépendant de la caspase-3 et de la pyroptose dépendant de la caspase-1 dans la déplétion des lymphocytes T CD4⁺ au cours de l'infection par le VIH-1 (Doitsh and Greene 2016). Au cours d'une infection chronique par le VIH-1, une grande fraction de cellules T CD4⁺ est déplétée dans les tissus lymphoïdes secondaires. (Droite) Si le virus infecte une cellule activée (permissive), cette dernière meurt d'une apoptose silencieuse médiée par la caspase-3. (Gauche) Si le virus infecte une cellule quiescente, une infection abortive se produit entraînant l'accumulation de transcrits d'ADN viral cytosolique incomplets détectés par le récepteur IFI16. Ce capteur s'assemble dans un inflammasome où la caspase-1 est activée, ce qui déclenche à son tour la pyroptose qui nécessite absolument une transmission cellule-à-cellule des virions.

La déplétion des lymphocytes T CD4⁺ par pyroptose s'auto-amplifie par la libération de signaux de danger proinflammatoires tels que l'ATP (Adénosine Triphosphate) par les lymphocytes T CD4⁺ pyroptotiques. Ces signaux de danger fournissent un deuxième stimulus inflammatoire, conduisant à l'activation de la caspase-1 par l'inflammasome NLRP3 dans les lymphocytes T CD4⁺ environnants. Ainsi, une pyroptose initiée par le VIH-1 peut déclencher une avalanche de nouvelles séries de pyroptoses dans des cellules CD4⁺ sensibilisées par la

libération répétée d'ATP intracellulaire de manière indépendante du virus. La mise en place de ce cercle vicieux «auto-inflammatoire» empêche de restaurer le pool de cellules T CD4⁺ même lorsque la réplication virale est réduite par un traitement c-ART car les lymphocytes T CD4⁺ activés circulants qui entrent dans ces tissus sont eux aussi éliminés (Doitsh and Greene 2016).

I. 5. b. La translocation microbienne

L'infection par le VIH-1 a un impact sur l'homéostasie des LT CD4⁺ localisés dans le tractus gastro-intestinal (Mattapallil, Douek et al. 2005). En effet, ce dernier est le siège d'une déplétion massive de LT CD4⁺ étant pour la plus part activés (CCR5+) (Lackner and Veazey 2007) faisant d'eux une cible privilégiée du virus (Veazey, Mansfield et al. 2000, Mehandru, Poles et al. 2006, Lackner and Veazey 2007). Les tissus lymphoïdes, notamment ceux associés à la muqueuse du tube digestif (GALT, *gut-associated lymphoid tissues*), contiennent une grande fraction de LT CD4⁺ de l'organisme (Haase 1999), faisant du GALT l'un des principaux sites d'élimination des lymphocytes T CD4⁺ et de réplication du VIH-1 (Figure 10) (Lafeuillade, Poggi et al. 1997, Brenchley, Schacker et al. 2004, Luteijn, Sciaranghella et al. 2011). En plus d'une perte quantitative des LT CD4⁺ totaux, une déplétion préférentielle de la fraction LT CD4⁺ Th17 effectrice mémoire est principalement observée (Brenchley, Paiardini et al. 2008, Cohen, Shaw et al. 2011). Cette déplétion n'est que partiellement corrigée après mise sous traitements c-ART (Brenchley, Paiardini et al. 2008, Mavigner, Cazabat et al. 2012, Kok, Hocqueloux et al. 2015).

Les cellules LT CD4⁺ Th17 sont particulièrement cruciales pour la protection de la muqueuse intestinale (Aggarwal, Ghilardi et al. 2003, Steinman 2007). Ces cellules se distinguent des LT CD4⁺ Th1 ou Th2 par la sécrétion de l'interleukine 17 (IL-17) qui joue un rôle important dans l'immunité adaptative contre les bactéries extracellulaires et les champignons, en permettant le recrutement des neutrophiles et la production de peptides antimicrobiens par les cellules épithéliales (Chung, Kasper et al. 2003, Huang, Na et al. 2004), et de l'IL-22 qui favorise la régénération de l'épithélium (Schuetz, Deleage et al. 2014). En plus de l'IL-17, elles peuvent être productrices de TNF α , d'IL-1, d'IL-2, d'IL-22 et d'IL-21, ce qui reflète leur potentiel pro-inflammatoire. Via la sécrétion de G-CSF, un facteur de croissance des granulocytes, ces cellules peuvent recruter des neutrophiles et des cellules myéloïdes dans les

sites effecteurs (Ye, Garvey et al. 2001). Par conséquent, l'élimination massive des cellules lymphoïdes du tractus gastro-intestinal rompt l'homéostasie de la barrière intestinale et augmente sa perméabilité, provoquant une translocation microbienne (Brenchley, Price et al. 2006, Klatt and Brenchley 2010, Klatt, Funderburg et al. 2013). Il en résulte une accentuation de l'activation immunitaire et de l'inflammation chronique de la muqueuse digestive, aggravant d'avantage l'altération de la barrière intestinale et la déplétion des LT CD4⁺ recrutés par l'activation immunitaire (Klatt, Chomont et al. 2013) et provoque des dépôts de collagène dans le GALT (Zeng, Smith et al. 2011, Zeng, Southern et al. 2012).

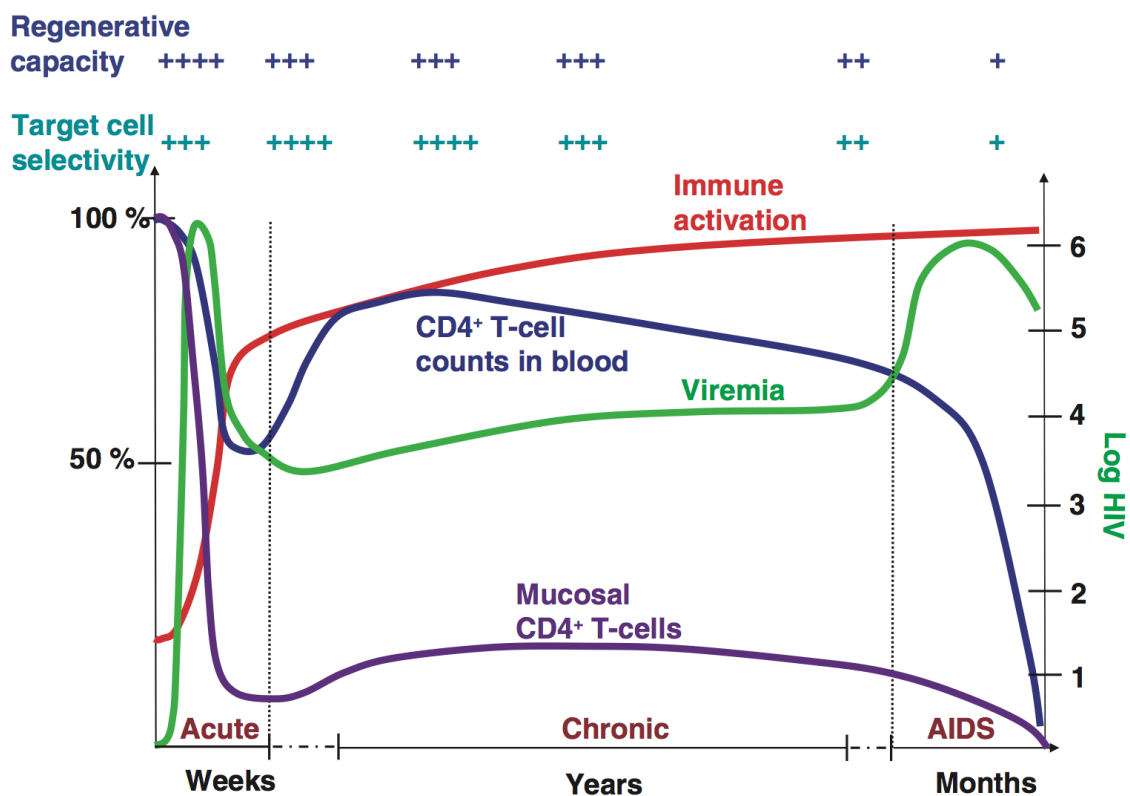


Figure 10. Mesures quantitatives et qualitatives des paramètres virologiques et immunologiques au cours de l'infection par le VIH-1 (Grossman, Meier-Schellersheim et al. 2006). L'infection par le VIH-1 débute par une répllication et une dissémination massive du virus dans l'organisme. Tout au long de l'infection, le système immunitaire s'active de manière chronique et perd au fur et à mesure ses capacités de régénération. En phase aiguë de l'infection, les lymphocytes T CD4⁺ sont éliminés de manière irréversible au niveau des muqueuses. Cette phase aiguë se caractérise par un pic de charge virale associé à l'apparition des premières réponses du système immunitaire, suivie d'une phase chronique asymptomatique qui évolue en stade SIDA avec un taux de LT CD4⁺ inférieur à 200 LT/mm³.

En plus de la translocation microbienne, d'autres mécanismes peuvent être responsables de l'inflammation chronique, tels que : la persistance virale, le dysfonctionnement du système

immunitaire, l'atteinte métabolique, les coïnfections, la dysbiose, l'effet toxique des traitements c-ART ... Ainsi, un cercle vicieux se met en place dès la phase aiguë et persiste en phase chronique quand l'inflammation devient systémique.

I. 5. c. L'épuisement du système immunitaire : inflammation et activation

L'épuisement progressif des réponses immunitaires est une conséquence de toutes les altérations immunologiques susmentionnées. En effet, l'installation de l'inflammation chronique perturbe la mise en place de réponses immunitaires efficaces spécifiques du VIH-1 et conduit à un épuisement immunitaire. En plus des LT CD4⁺, cet épuisement cible également, en particulier lors de l'infection chronique, les fractions de LT CD8⁺ effecteurs (Klenerman and Hill 2005, Wherry 2011), les NK (natural killer) et les lymphocytes B. Dans ce document, nous nous concentrerons principalement sur les lymphocytes T.

Au cours de la phase chronique de l'infection, l'inflammation chronique stimule des réponses immunorégulatrices par expansion de lymphocytes T régulateurs T(reg) (Fritzsching, Oberle et al. 2005, Bandera, Ferrario et al. 2010, Weiss, Piketty et al. 2010, Chevalier and Weiss 2013) et conduit les lymphocytes T CD4⁺ et T CD8⁺ à surexprimer des marqueurs d'activation et/ou apoptose (Groux, Torpier et al. 1992, Finkel, Tudor-Williams et al. 1995, Deeks, Kitchen et al. 2004), si bien que le niveau d'activation des LT prédit la vitesse à laquelle les LT CD4⁺ seront déplétés dans le temps (van Asten, Danisman et al. 2004). L'activation des LT était définie au départ par l'expression des marqueurs d'activation HLA-DR et CD38, et de prolifération Ki67 (Leng, Borkow et al. 2001, Deeks, Kitchen et al. 2004). L'expression accrue de ces marqueurs sur les LT CD8⁺ était associée à l'effondrement des T CD4⁺ et la progression de maladies opportunistes (Liu, Cumberland et al. 1997). L'expression de PD-1 (protéine de mort cellulaire programmée), molécule immunorégulatrice, est elle aussi augmentée dans les LT CD4⁺ et T CD8⁺ spécifiques du VIH-1. Cette expression de PD-1 est en corrélation avec le taux de T CD4⁺ circulants et la charge virale, et le blocage de la voie PD-1 permet de restaurer les réponses spécifiques des LT CD4⁺ et T CD8⁺ (Day, Kaufmann et al. 2006, Trautmann, Janbazian et al. 2006).

De même, l'inflammation chronique et l'activation immunitaire conduisent à l'épuisement des LT CD4⁺ lesquels, par conséquent, perdent leur capacité proliférative, voient leur capacité de

poly-fonctionnalité (production de multiples cytokines, IL-2 en particulier) diminuée (Palmer, Boritz et al. 2004) et surexpriment des molécules inhibitrices telles CTLA-4 (cytotoxic T-lymphocyte associated protein 4) (Kaufmann, Kavanagh et al. 2007) et des molécules d'épuisement telles que PD-1 et Tim3 (immunoglobuline des cellules T mucine-3) (Rallon, Garcia et al. 2018). L'infection chronique par le VIH-1 est associée à une activation immunitaire accrue et à l'épuisement immunitaire. Dans ce cadre, l'expression de PD-1 reste difficile à interpréter car c'est à la fois un marqueur d'activation au cours du stade précoce de l'infection mais aussi un marqueur d'épuisement et d'inhibition dans les phases tardives (Day, Kaufmann et al. 2006, D'Souza, Fontenot et al. 2007).

L'activation continue et l'exposition persistante au virus conduisent également les lymphocytes T CD8⁺ mémoires vers un état d'épuisement et à la dérégulation de leur capacité de renouvellement. Leur épuisement est caractérisé par la perte de leur phénotype mémoire centrale et à la réduction de leur potentiel prolifératif et de leur production de cytokines. Les LT CD8⁺ épuisés expriment alors à leur surface des récepteurs inhibiteurs tels que PD-1, LAG-3 (protéine du gène-3 d'activation des lymphocytes), CD160 et Tim-3 (Desai and Landay 2010, Peretz, He et al. 2012).

L'activation immunitaire provoque au niveau des ganglions lymphatiques une expansion anormale des LT CD4⁺ effecteurs mémoires non spécifiques au VIH-1 mais hautement susceptibles à l'infection (Pantaleo, Graziosi et al. 1993, Brenchley, Schacker et al. 2004)). Cette accumulation de cellules CD4⁺ fait suite à une conversion accrue de cellules naïves en cellules effectrices, ainsi que leur activation et leur recrutement sur ce site de réplication virale active dans le but de compenser la perte en LT CD4⁺ effecteurs mémoires (Guihot, Bourgarit et al. 2011). Ce phénomène d'accumulation de cellules T effectrices mémoires est corrélé à un dépôt accru de collagène dans les ganglions lymphatiques et associé à l'inflammation et à l'activation immunitaire chronique. De plus, l'activation des cellules B, caractérisée par une hyperplasie marquée du centre germinatif, aggrave les dommages architecturaux des ganglions. Ainsi, le trafic de cellules T vers le réseau de cellules dendritiques folliculaires, dépendant d'une architecture intacte des ganglions lymphatiques, est par conséquent compromis. De cette façon, ce qui était un organe de présentation de l'antigène et d'homéostasie devient un site d'inflammation fibrosé lors d'une infection par le VIH-1 (Brenchley, Schacker et al. 2004).

En conclusion, l'inflammation chronique et l'activation immunitaire exacerbent l'altération de l'homéostasie des LT CD4⁺ et accentuent l'épuisement du système immunitaire lequel, graduellement, perd ses capacités de régénération dans les tissus lymphoïdes (Khaitan and Unutmaz 2011).

I. 6. Contrôle de l'infection et rémission de la maladie

En l'absence de traitement c-ART, l'infection progresse généralement vers le stade SIDA. Cependant, une faible proportion de patients infectés (5% à 15%) résiste mieux à l'infection et à la progression de la maladie (Sheppard, Lang et al. 1993, Cao, Qin et al. 1995, Munoz, Kirby et al. 1995, Pantaleo, Menzo et al. 1995, Deeks and Walker 2007). Ces patients possèdent un système immunitaire capable de faire face à l'infection sans traitement c-ART (Cao, Qin et al. 1995), et sont appelée «long-term nonprogressors» ou LTNP. A ce jour, au moins deux sous-groupes de patients séropositifs LTNP ont été identifiés : les « *elite controllers* » et les « *viremic controllers* ». Une autre catégorie de patients « VISCONTI » qualifiés de « post-treatment controllers » a également été mise en évidence, en plus de cas rares de guérison de la maladie, notamment le « patient de Berlin » et le « bébé du Mississippi », qui ont également été rapportés (Figure 11).

Comme les tests de la charge virale n'étaient disponibles qu'au milieu des années 90, l'appellation LTNP était définie au départ en fonction de la durée de l'infection (au moins 10ans) et du nombre de lymphocytes T CD4⁺ dans le sang (> 500 cellules/ul) (Lifson, Buchbinder et al. 1991). Lorsque ces tests ont été rendus disponibles, l'hétérogénéité des patients LTNP et leur capacité à contrôler spontanément la réplication du VIH-1 sont devenues évidentes. La plupart des patients LTNP présentaient des taux de virémie faibles à modérés (de 50 à 2000 copies d'ARN / mL) et un suivi plus poussé a révélé que certains d'entre eux avaient une charge virale croissante et une diminution du nombre de lymphocytes T CD4⁺ (O'Brien, Blattner et al. 1996, Lefrere, Morand-Joubert et al. 1997, Goudsmit, Bogaards et al. 2002, Rodes, Toro et al. 2004).

On distingue les « *elite controllers* » aussi appelés « *elite suppressors* », estimés à environ 1 personne infectée sur 300 et capables de maintenir une charge virale inférieure aux limites de détection (<50 copies ARN/ml plasma, au cours d'une période de 12 mois) (Pereyra, Addo et

al. 2008). Le sous-groupe des « *viremic controllers* » est constitué de patients qui maintiennent une faible virémie en l'absence de traitement c-ART (généralement moins de 2000 copies ARN/ml plasma). Les « *viremic controllers* » représentent jusqu'à 7% de tous les patients séropositifs. Plusieurs études ont montré que le contrôle spontané de la réplication virale pouvait durer de très longues périodes (plus de 30 ans) (Walker and Yu 2013).

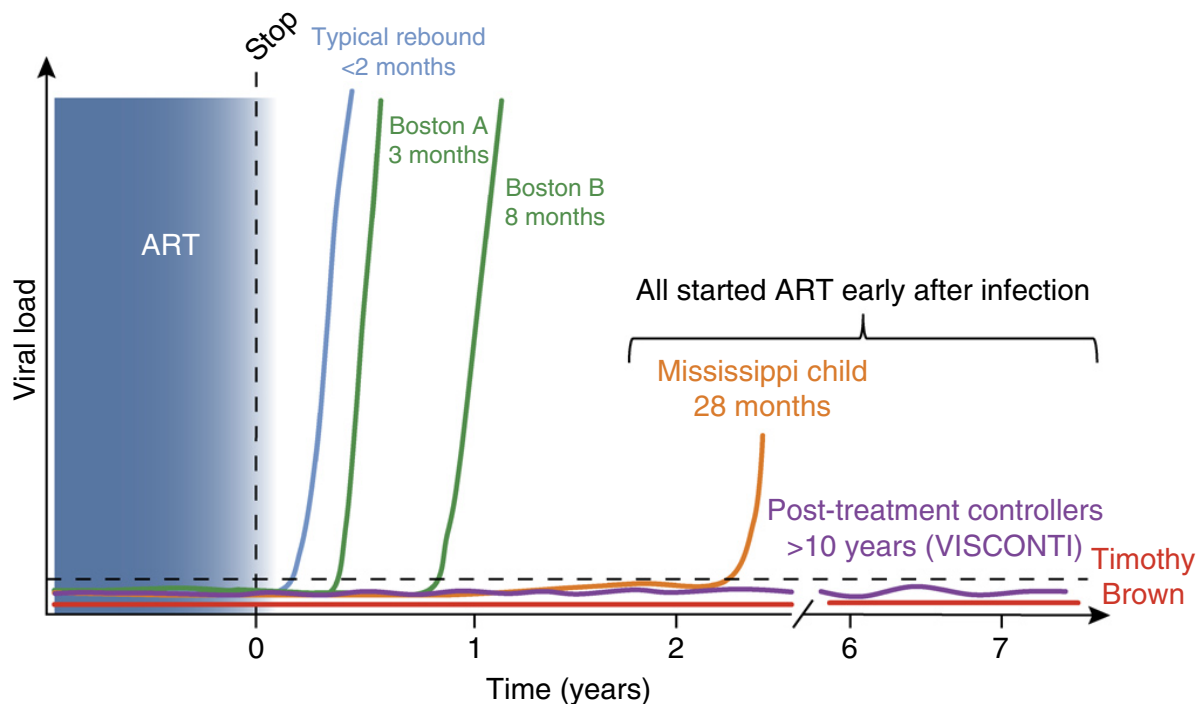


Figure 11. Cas de rémission transitoire ou prolongée de la maladie après traitement antirétroviral (Deeks, Lewin et al. 2016). Le rebond viral après arrêt du traitement survient généralement dans les 2-3 semaines. Dans certaines circonstances, le rebond viral a été considérablement retardé dans le cadre d'une greffe de cellules souches (patients A et B de Boston) et d'un traitement antirétroviral très précoce chez un nourrisson « bébé du Mississippi ». Les patients « post-treatment controllers » ont d'abord été décrites dans le cadre de l'étude VISCONTI en France. Ces personnes ont un contrôle post-traitement à long terme et le traitement antirétroviral était presque toujours instauré lors de l'infection aiguë et le virus était généralement détecté à de faibles concentrations dans le plasma. Timothy Brown reste le seul individu séropositif hors traitement antirétroviral sans virus détecté dans le sang ou les tissus. Il a reçu une greffe de cellules souches d'un donneur porteur d'une mutation génétique rare et dont les cellules présentaient une délétion homozygote CCR5 Δ 32 (la mutation delta-32), et n'a pas été traité pendant plus de 7 ans.

L'analyse des bases de données d'un certain nombre de cliniques françaises a permis à des chercheurs de constituer une cohorte de 14 patients (10 hommes et 4 femmes) qui sont par la suite devenus les sujets d'une étude appelée VISCONTI pour *Virological and Immunological Studies in CONTrollers after Treatment Interruption*. Ces patients, qualifiés de « post-treatment

controllés », ont été infectés entre 1996 et 2002 et tous avaient commencé un traitement c-ART dans les quatre à dix semaines suivant la détection de l'infection primaire. Ces patients ont par la suite interrompu leur traitement mais leur charge virale est restée relativement faible durant plusieurs années post-interruption (<400 copies/ml) (Saez-Cirion, Bacchus et al. 2013).

Un seul cas au monde de malade guéri du SIDA a été jusqu'ici décrit. Il s'agit de l'Américain Timothy Brown, connu aussi comme le « patient de Berlin ». Déclaré séropositif en 1995, Timothy Brown n'a montré aucun signe d'infection depuis 2007. Ce patient atteint de leucémie a subi plusieurs chimiothérapies et reçu deux greffes de moelle osseuse provenant d'un donneur porteur d'une mutation génétique rare et dont les cellules présentaient une délétion homozygote CCR5 Δ 32 (la mutation delta-32) (Hutter, Nowak et al. 2009). Depuis, ce patient contrôle le VIH-1 sans traitement et aucune trace du virus n'était retrouvée chez ce patient dans les multiples prélèvements tissulaires effectués. En effet, plusieurs années plus tard, le VIH-1 demeure indétectable dans son sang et dans ses différents tissus (moelle osseuse, cerveau, côlon). Certains chercheurs ont cependant trouvé des traces d'ARN viral résiduel dans certains tissus de Timothy Brown. On ne sait donc pas s'il est réellement guéri, néanmoins, l'histoire du « Patient de Berlin » a ouvert de nouvelles pistes de recherche autour du récepteur CCR5.

En Mars 2013, il a été annoncé qu'un bébé né dans le Mississippi avait guéri du VIH-1 après avoir reçu un traitement suppressif immédiatement après la naissance. En effet, l'enfant a été dépisté à la naissance et mis sous traitement c-ART dès sa 31^{ème} heure de vie. Il est resté sous antirétroviraux (ARV) pendant 18 mois avant d'être perdu de vue jusqu'à ses 24 mois, une période pendant laquelle il n'a pas reçu de traitements c-ART et la charge virale de l'enfant était restée indétectable malgré l'arrêt des traitements (Persaud, Gay et al. 2013). Son état étant « stable », il n'a pas repris d'antirétroviraux, jusqu'à ce qu'un rebond virale survienne à l'âge de 45 mois. L'enfant avait passé 27 mois sans traitements et une charge virale indétectable.

II. Le VIH-1 et le facteur de restriction SAMHD1

II. 1. Caractéristiques et fonctions des facteurs de restriction, mécanismes d'échappement viral

En plus de devoir constamment échapper aux mécanismes mis en place par le système immunitaire, le VIH-1 doit contrecarrer l'activité de facteurs de restriction intrinsèques des cellules hôtes. Il s'agit de diverses protéines capables de bloquer la réplication du virus en agissant à différents stades de son cycle de vie, mais dont l'activité peut être inhibée par les protéines virales (Altfeld and Gale 2015, Jia, Zhao et al. 2015, Simon, Bloch et al. 2015). Ces protéines sont soit exprimées de manière constitutive, soit induites par des facteurs tels que l'IFN-1 (interféron de type 1) en cas d'infection virale dans l'organisme (Doyle, Goujon et al. 2015). A l'heure actuelle, plusieurs facteurs de restriction ont été identifiés. Seuls quatre facteurs de restriction les mieux caractérisés seront abordés dans ce manuscrit, on distingue notamment : TRIM5 α (Tripartite motif-containing protein 5 α), APOBEC3G (apolipoprotein B mRNA editing enzyme catalytic polypeptide-like 3), la tétherine et SAMHD1 (sterile alpha motif and histidine-aspartate domain-containing protein 1) (Figure 12).

Chez le primate, les protéines TRIM5 α sont capables de restreindre le SIV (Sayah, Sokolskaja et al. 2004, Stremlau, Owens et al. 2004, Grutter and Luban 2012), et agissent en provoquant un démantèlement précoce de la capsid, dont les éléments constituent des cibles pour la dégradation par la machinerie cellulaire empêchant ainsi la synthèse d'ADNc viral (Stremlau, Owens et al. 2004). En effet, cette protéine peut interagir avec la protéine de capsid virale (Stremlau, Perron et al. 2006) et il a été montré que son activité ubiquitine-ligase est nécessaire pour bloquer le cycle viral avant l'étape de transcription inverse (Lienlaf, Hayashi et al. 2011, Pertel, Hausmann et al. 2011). En revanche, le facteur de restriction TRIM5 α est particulier car la protéine humaine n'est pas capable d'inhiber la réplication du VIH-1 chez l'homme (Grutter and Luban 2012).

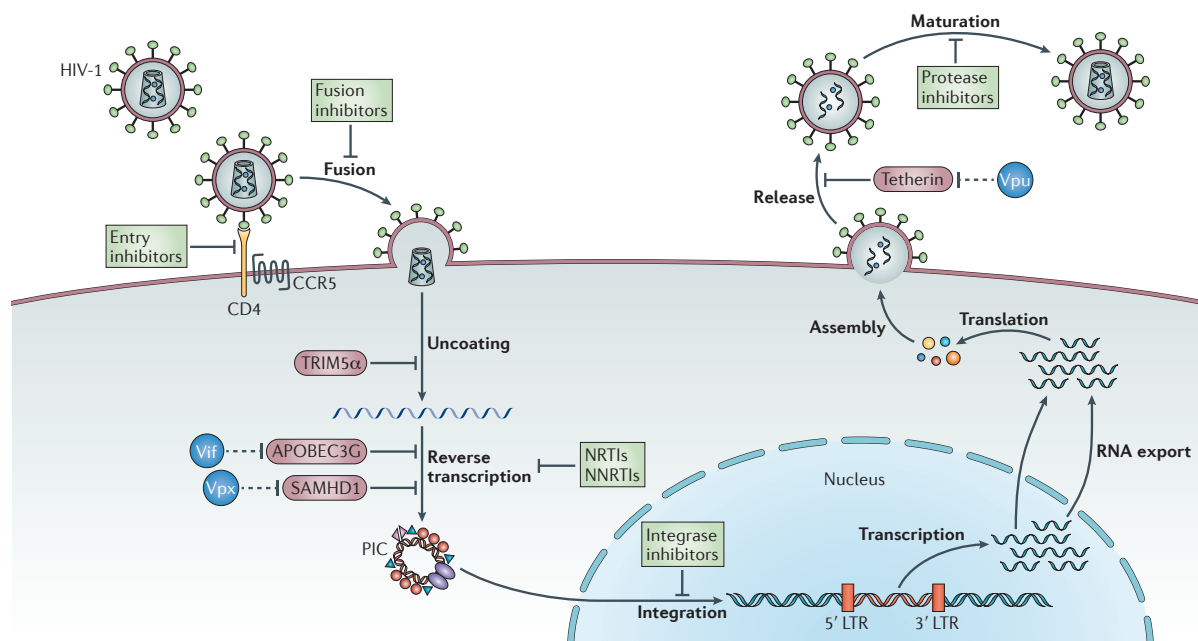


Figure 12. Interaction du VIH-1 avec des facteurs de restriction et de résistance au cours de son cycle de vie ((Barre-Sinoussi, Ross et al. 2013). Quatre facteurs de restriction de la réplication virale ont été identifiés: APOBEC3G, TRIM5 α , tetherine et SAMHD1. Ces facteurs de restriction peuvent cibler un certain nombre d'étapes de la réplication du VIH-1 à l'intérieur de la cellule hôte, dont : la décapsidation, la transcription inverse et la libération du virions nouvellement synthétisés.

APOBEC3G est un autre facteur de restriction qui agit en phase précoce du cycle viral, précisément au niveau de la transcription inverse. APOBEC3G est une cytidine déaminase qui introduit des hypermutations somatiques (C, cytidine vers U uracile) dans l'ADNc viral en formation (Feng, Baig et al. 2014), provoquant une inhibition de la transcription inverse. Ces hypermutations du génome viral sont délétères pour le virus (Mangeat, Turelli et al. 2003) et les mutations introduites dans le premier brin d'ADN viral perturbent la transcription du second brin (Klarmann, Chen et al. 2003). APOBEC3G est une protéine cytoplasmique qui peut s'encapsuler dans les virions nouvellement synthétisés au cours du bourgeonnement, pour être transportée dans les prochaines cellules cibles infectées par ces virions et produire des mutations dans l'ADN viral (Feng, Baig et al. 2014). Ce facteur de restriction est identifié comme le facteur de restriction qui est contrecarré par la protéine virale Vif ce qui permet l'infection de cellules non permissives par le VIH-1 (Madani and Kabat 1998). En effet, il a été montré que Vif exerçait une action inhibitrice à la traduction d'APOBEC3G et induisait la dégradation de cette protéine de manière dépendante du protéasome, l'empêchant ainsi de s'encapsuler dans les virions nouvellement synthétisés (Sheehy, Gaddis et al. 2002, Stopak, de Noronha et al. 2003). De ce fait, APOBEC3G peut empêcher l'infection par le VIH-1 en

provoquant une hypermutation du génome viral uniquement en cas d'absence de Vif (Lecossier, Bouchonnet et al. 2003, Zhang, Yang et al. 2003).

D'autres membres de la famille des cytidines déaminases APOBEC3 sont capables de bloquer l'infection par le VIH-1, notamment APOBEC3F (Zheng, Irwin et al. 2004), elle aussi dégradée par l'action de Vif (Liu, Sarkis et al. 2005), et APOBEC3A (Berger, Durand et al. 2011). Il a également été montré qu'APOBEC3G est capable de bloquer la transcription inverse d'autres rétrovirus en plus du VIH-1 (Mangeat, Turelli et al. 2003).

La tetherine, aussi connue sous le nom de BST-2, se distingue des autres facteurs de restriction par son action en phase tardive du cycle viral. En effet, la BST-2 limite le bourgeonnement (Neil, Zang et al. 2008, Van Damme, Goff et al. 2008) et empêche la libération des virions nouvellement synthétisés (Sauter, Specht et al. 2010). BST-2 a une structure particulière car elle possède à la fois un domaine transmembranaire et une ancre GPI, lui conférant la capacité de physiquement séquestrer les virions (Perez-Caballero, Zang et al. 2009) et d'empêcher leur libération et l'infection de cellules voisines (Casartelli, Sourisseau et al. 2010).

L'activité antivirale de BST-2 est quant à elle contrecarrée par la protéine virale Vpu via divers mécanismes d'action (Sauter, Schindler et al. 2009). La protéine Vpu peut interagir avec l'ubiquitine-ligase β TrCP pour inhiber l'activité antivirale de BST-2 (Miyagi, Andrew et al. 2009) ou induire une dégradation de BST-2 dépendante du protéasome (Douglas, Viswanathan et al. 2009, Mangeat, Gers-Huber et al. 2009) ou des lysosomes (Iwabu, Fujita et al. 2009, Mitchell, Katsura et al. 2009).

II. 2. SAMHD1, identification d'un nouveau facteur de restriction

Le rôle de la protéine virale Vpx, exprimée par le VIH-2, VIS_{SM} et VIS_{MAC}, a été décrit dès 1999 comme étant nécessaire à l'infection des cellules myéloïdes, notamment les cellules dendritiques dérivées de monocytes (Goujon, Jarrosson-Wuilleme et al. 2006), les monocytes (Goujon, Arfi et al. 2008, Kaushik, Zhu et al. 2009) et les macrophages (Fletcher, Brichacek et al. 1996, Sharova, Wu et al. 2008, Srivastava, Swanson et al. 2008) chez le macaque et chez l'homme, mais pas à celles des lymphocytes (Hirsch, Sharkey et al. 1998). Plusieurs études ont montré que Vpx est capable de contrecarrer un facteur de restriction cellulaire actif dans les

cellules myéloïdes qui agit en phase précoce du cycle viral. Cette protéine interagissant avec Vpx a été identifiée en 2011, il s'agit du facteur de restriction SAMHD1 (Berger, Sommer et al. 2011, Hrecka, Hao et al. 2011, Laguette, Sobhian et al. 2011).

SAMHD1 a initialement été identifié comme un facteur de restriction de l'infection par le VIH-1 dans les cellules dendritiques (Laguette, Sobhian et al. 2011), les monocytes (Berger, Sommer et al. 2011), les macrophages (Hrecka, Hao et al. 2011) et les cellules de la lignée THP-1 (Laguette, Sobhian et al. 2011), contrecarré par la protéine virale Vpx. En effet, en 2012, Descours et Baldauf ont montré que SAMHD1 est exprimé dans les lymphocytes T CD4⁺ quiescents et que ce dernier limite l'infection de ces cellules par le VIH-1 (Baldauf, Pan et al. 2012, Descours, Cribier et al. 2012). De façon intéressante le traitement des lymphocytes T CD4⁺ quiescents par la protéine Vpx induit la dégradation de SAMHD1 et augmente l'infection de ces cellules par le VIH-1.

SAMHD1 s'est par la suite avéré actif contre d'autres virus et dans d'autres populations cellulaires. En effet, SAMHD1 représente également un facteur de restriction actif dans les macrophages et les cellules de la lignée THP-1 contre certains rétrovirus de différents genres, notamment : le VIF (virus de l'immunodéficience féline), l'EIAV (virus de l'anémie infectieuse des équidés), le virus du sarcome de Rous et le MPMV (Mason-Pfizer Monkey virus) (Gramberg, Kahle et al. 2013, White, Brandariz-Nunez et al. 2013). SAMHD1 empêche aussi l'infection des cellules THP-1 par le MLV (virus de la leucémie murine B ou N tropiques) et le virus de l'immunodéficience bovine (VIB) (White, Brandariz-Nunez et al. 2013). De même, une étude a montré que l'expression de SAMHD1 dans des cellules de lignées hépatiques pouvait empêcher leur infection par le virus de l'hépatite B (Berger, Sommer et al. 2011).

II. 2. a. Activités de SAMHD1

SAMHD1 est une protéine de 626 acides aminés (Goldstone, Ennis-Adeniran et al. 2011) composée : d'un domaine SAM (Sterile Alpha Motif) N-terminal conservé, précédé par un signal de localisation nucléaire (NLS), impliqué dans des interactions avec des acides nucléiques notamment des ARN (Kim and Bowie 2003) ou des interactions protéine-protéine, et d'un domaine HD (Hydroles, Histidine/Aspartate) pouvant jouer le rôle d'une

phosphohydrolase (Aravind and Koonin 1998), ainsi qu'une région C-terminale qui, en présence de Vpx, intervient dans le recrutement du complexe E3-ligase et marque SAMHD1 pour la dégradation (Powell, Holland et al. 2011). A ce jour, deux activités catalytiques ont été attribuées à la protéine SAMHD1 : une activité dNTP triphosphohydrolase et une activité exonucléase.

II. 2. a. 1. Activité dNTP triphosphohydrolase

SAMHD1 est une désoxynucléoside triphosphate (dNTP) triphosphohydrolase capable de convertir les dNTP en désoxynucléotides et en triphosphate inorganique (Goldstone, Ennis-Adeniran et al. 2011, Powell, Holland et al. 2011, Amie, Bambara et al. 2013) lors d'une stimulation par le dGTP (désoxyguanosine triphosphate) (Kim, Nguyen et al. 2012) ou le GTP (guanosine triphosphate) (Hansen, Seamon et al. 2014). Cette activité de SAMHD1 a été testée sur des acides nucléiques polymérisés (ADN simple brin, double brin ou ARN) et sur d'autres types de nucléotides (désoxynucléosides mono ou di-phosphates), mais aucune activité phosphohydrolase n'a été observée. De plus, Powell a démontré en 2011 que l'activité dNTPase de SAMHD1 était exclusivement dépendante du domaine HD de cette protéine (Powell, Holland et al. 2011).

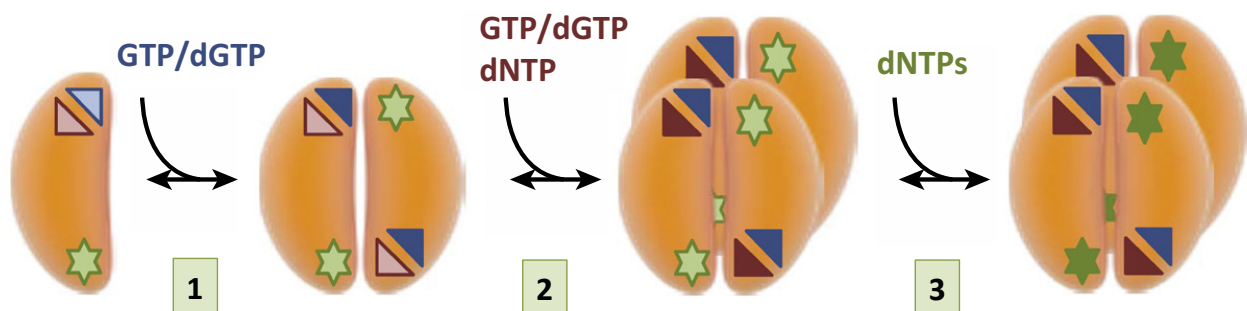


Figure 13. Schéma de l'activité dNTPase de SAMHD1 et formation séquentielle des tétramères (adapté de (Ballana and Este 2015)). (1) Dimérisation de la protéine par fixation d'un GTP ou d'un dGTP au niveau du site activateur. (2) Tétramérisation de la protéine par fixation d'un dNTP au niveau des sites activateurs du dimère. (3) Activité catalytique du tétramère sur les dNTP.

Dans la cellule, SAMHD1 peut être présent sous forme monomérique ou dimérique, mais son activité dNTPase n'est exercée que par sa forme tétramérique (Figure 13) (Ji, Wu et al. 2013, Yan, Kaur et al. 2013, Zhu, Gao et al. 2013). Après son action de clivage des dNTP,

cette forme tétramérique de SAMHD1 est capable de persister même en absence de GTP et de dNTP (Hansen, Seamon et al. 2014). Ces tétramères se forment de façon séquentielle : l'interaction de SAMHD1 avec le GTP promeut la formation de dimères. La reconnaissance de dNTP par ces dimères au niveau d'un site régulateur promeut à son tour la formation de tétramères pourvus d'activité dNTPase (Ji, Tang et al. 2014, Koharudin, Wu et al. 2014, Miazzi, Ferraro et al. 2014, Li, Kong et al. 2015).

SAMHD1 peut donc restreindre l'infection par le VIH-1 en diminuant la quantité de dNTP disponible dans les cellules. La diminution des dNTP, nécessaires à la synthèse de l'ADN viral bloquerait la phase de transcription inverse.

II. 2. a. 2. Activité exonucléase

Bien que le consensus accepté soit que SAMHD1 limite l'infection du VIH-1 par la déplétion des dNTP intracellulaires, plusieurs études réalisées *in vitro* ont montré que SAMHD1 interagit avec l'ARN simple brin et l'ADN simple brin (Goncalves, Karayel et al. 2012, Tungler, Staroske et al. 2013), et que cette protéine possède une activité nucléase sur ces deux substrats, dépendante de la présence de cations métalliques (Figure 14). Cette activité a été caractérisée par la suite comme étant une activité exonucléase 3' vers 5' clivant les nucléotides un par un, et capable de dégrader les ARN et les ADN simple brin y compris ceux codant pour les protéines Gag et Tat du VIH-1. Il a également été montré que cette activité exonucléase de SAMHD1 est fortement dépendante du domaine HD mais également du domaine SAM, sans lequel l'activité nucléase serait limitée (Beloglazova, Flick et al. 2013).

En présence des deux substrats (ADN et ARN simple brin), les études de Bürckstümmer et de Yakunin ont démontré que SAMHD1 interagissait préférentiellement avec l'ARN (Goncalves, Karayel et al. 2012, Beloglazova, Flick et al. 2013), en revanche, l'équipe de Ahn a montré plus tard une activité nucléase dirigée uniquement sur les ARN simples brins (Ryoo, Choi et al. 2014). Les travaux *in vivo* de Ahn montrent également l'activité nucléase de SAMHD1 dans les lymphocytes T CD4⁺ quiescents et dans les macrophages, permettant la dégradation du génome du VIH-1 dès les phases précoces de la transcription inverse (Ryoo, Choi et al. 2014).

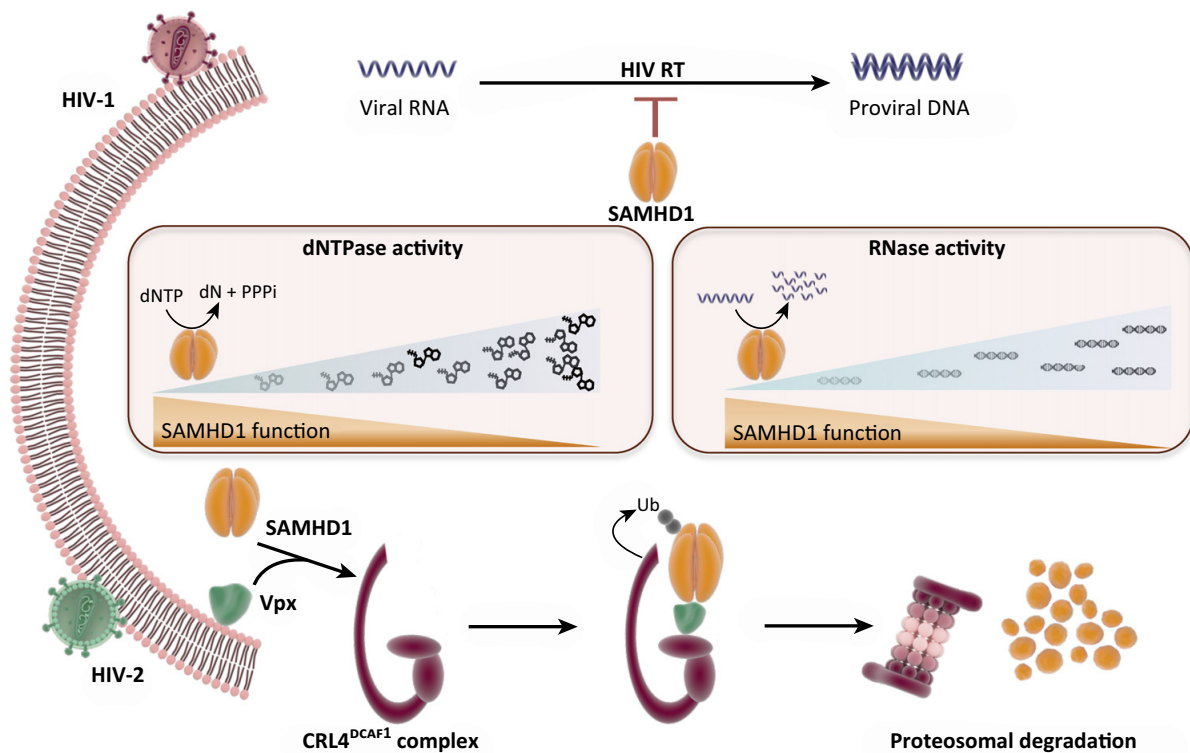


Figure 14. Représentation schématique des différents mécanismes de restriction médiés par SAMHD1 (adapté de (Ballana and Este 2015)). SAMHD1 limite l'infection par le VIH-1 en boquant la phase de transcriptase inverse. Les mécanismes de restriction sous-jacents aux fonctions dNTPase (Gauche) et RNase (Droite) sont représentés. La protéine Vpx du HIV-2 induit la dégradation de SAMHD1 en le ciblant sur le protéasome par addition d'ubiquitine (Ub), et contourne la restriction virale de SAMHD1.

De façon intéressante, ces diverses études ayant mis en évidence l'activité exonucléase de SAMHD1, montrent aussi qu'en présence de dGTP, cette activité est inhibée (Beloglazova, Flick et al. 2013, Ryoo, Choi et al. 2014). L'équipe de Yakunin a démontré également que la présence de dGTP pouvait inhiber l'interaction de SAMHD1 avec les acides nucléiques (Beloglazova, Flick et al. 2013). En parallèle de ces études, le groupe de Kim a démontré qu'en contre partie, l'activité dNTPase de SAMHD1 n'était en aucun cas inhibée en présence d'ADN ou d'ARN simples brins (Amie, Bambara et al. 2013).

II. 2. b. Régulation de l'expression de SAMHD1

II. 2. b. 1. Modulation en phase transcriptionnelle et post-transcriptionnelle

Les travaux de De Silva ont montré que la méthylation du promoteur de SAMHD1 est à l'origine de l'inhibition de l'expression de la protéine. En effet, ces résultats montrent que dans

les lymphocytes T CD4⁺ et les cellules de lignées THP-1 qui expriment la protéine SAMHD1 et l'ARNm correspondant, le promoteur de SAMHD1 n'est pas méthylé. Inversement, dans les cellules de lignée Jurkat le promoteur de SAMHD1 est méthylé et la protéine SAMHD1 n'est pas exprimée (de Silva, Hoy et al. 2013, de Silva, Wang et al. 2014). Dans le contexte d'une infection par le VIH-1, il a été observé que le traitement des monocytes par l'IFN de type-1 et des macrophages par une combinaison d'IL-12 et d'IL-18 pouvait induire l'expression de la protéine SAMHD1 et de l'ARNm correspondant. L'expression de SAMHD1 confère à ces cellules une résistance à l'infection (Berger, Sommer et al. 2011, Pauls, Jimenez et al. 2013). Il a été noté que dans certains cas, la protéine SAMHD1 n'est pas exprimée alors que le promoteur n'est pas méthylé. Le groupe de Wu a montré en 2014 que cela pouvait être dû à un mécanisme de régulation post – traductionnelle, impliquant un microARN (miR181) inhibiteur de l'ARNm SAMHD1 (Jin, Peng et al. 2014).

II. 2. b. 2. Régulation en phase post-traductionnelle

Comme SAMHD1 est également exprimé dans les lymphocytes T CD4⁺ activés qui sont favorables à l'infection productive, plusieurs études ont démontré une régulation post-traductionnelle de la fonction de SAMHD1 dans la restriction du VIH-1. Les résultats de ces études ont montré que SAMHD1 est phosphorylé au niveau de plusieurs sites, cependant, la phosphorylation de la thréonine 592 a été identifiée comme essentielle à la modulation de son activité de restriction du VIH-1 (Cribier, Descours et al. 2013, Welbourn, Dutta et al. 2013, White, Brandariz-Nunez et al. 2013, Pauls, Ruiz et al. 2014, St Gelais, de Silva et al. 2014). Ces résultats indiquent que la phosphorylation module la capacité de SAMHD1 à bloquer l'infection sans affecter la formation des tétramères, c'est à dire que la phosphorylation T592 abolit la restriction du VIH-1 par SAMHD1 sans modifier sa capacité à diminuer les niveaux de dNTP cellulaires (activité dNTPase) (Arnold, Groom et al. 2015, Tang, Ji et al. 2015). De plus, les groupes de Benkirane et de Strebel ont montré que la phosphorylation de T592 de SAMHD1 ne modifie ni sa sensibilité à Vpx, ni sa localisation nucléaire, ni son activité dNTPase (Cribier, Descours et al. 2013, Welbourn, Dutta et al. 2013).

SAMHD1 est phosphorylée par les kinase 1 ou 2 dépendantes de la cycline (CDK1 ou CDK2) en complexe avec les protéines cycline A ou cycline B régulatrices du cycle cellulaire (Welbourn, Dutta et al. 2013, White, Brandariz-Nunez et al. 2013). Cette régulation de la

fonction SAMHD1 est associée au cycle cellulaire, car la CDK1 et la cycline A sont fortement exprimées dans les cellules en division. En effet, SAMHD1 est phosphorylé au niveau de la T592 uniquement dans des cellules sujettes à des divisions cellulaires et non pas dans des cellules quiescentes ou différenciées (Cribier, Descours et al. 2013, Pauls, Ruiz et al. 2014). En outre, la phase S du cycle cellulaire nécessite des niveaux élevés de dNTP, indiquant une modulation de l'activité de dNTPase de SAMHD1 pendant le cycle cellulaire (Pauls, Ruiz et al. 2014).

Le groupe de Benkirane a d'ailleurs montré que le traitement avec de l'INF de type-1 de cellules de la lignée THP-1, de cellules dendritiques, de lymphocytes T CD4⁺ activés ou de macrophages induit une diminution de la phosphorylation sur la T592. Inversement, une activation par un traitement CD3/CD28/IL2 de lymphocytes T CD4⁺ ou de PBMC induit une augmentation de la phosphorylation (Cribier, Descours et al. 2013). Une autre étude, menée par le groupe d'Alcami, a évalué l'effet des γ c-cytokines telles que IL-2 et IL-7 et a déterminé qu'elles induisaient la phosphorylation de SAMHD1 dans les lymphocytes T CD4⁺ favorisant ainsi leur susceptibilité à l'infection par le VIH-1 (Coiras, Bermejo et al. 2016). De plus, il a été observé que le dasatinib, un inhibiteur des tyrosines kinases essentielles lors de l'activation des cellules T sous l'action de l'IL-7 (Johnston, Bacon et al. 1996), interférait avec la phosphorylation de SAMHD1 induite par l'IL-7, ce qui préserve son activité antivirale (Coiras, Bermejo et al. 2016).

Le groupe de Pancino a montré que l'induction de P21 (P21 Cip1/Waf), un régulateur du cycle cellulaire et inhibiteur de CDK, inhibait la réplication du VIH-1 dans les macrophages (Bergamaschi, David et al. 2009, Allouch, David et al. 2013). En effet, l'expression de P21 bloque la biosynthèse de dNTP dans les macrophages par régulation négative de la sous-unité RNR2 de la ribonucléotide réductase, une enzyme essentielle à la réduction des ribonucléotides en dNTP (Allouch, David et al. 2013). Par ailleurs, il a été démontré que P21 régulaient la phosphorylation de SAMHD1 dans les macrophages (Allouch, David et al. 2014, Pauls, Ruiz et al. 2014) car la capacité de P21 à inhiber CDK régule l'activité antivirale de SAMHD1 en altérant sa phosphorylation au niveau de la T592 induite par CDK (Cribier, Descours et al. 2013, Welbourn, Dutta et al. 2013, White, Brandariz-Nunez et al. 2013, Badia, Pujantell et al. 2016).

Les niveaux de protéines SAMHD1 peuvent être modifiés à différents stades du cycle cellulaire en fonction du type cellulaire (Franzolin, Pontarin et al. 2013, Yan, Hao et al. 2015). Le rôle des complexes cyclines (A, B)/CDK (1, 2) dans le mécanisme de régulation post-traductionnelle de SAMHD1 est avéré et indique que cette régulation est étroitement liée à celle du cycle cellulaire.

II. 2. b. 3. Importance de Vpx dans la régulation de SAMHD1

La protéine virale Vpx est exprimée par le VIH-2 et les VIS qui lui sont apparentés (VIS_{SM} et VIS_{MAC}) et lorsque cette protéine n'est plus exprimée par ces souches virales, celles-ci s'avèrent moins infectieuses (Fletcher, Brichacek et al. 1996, Sharova, Wu et al. 2008). En revanche, le VIH-1, le VIS_{CPZ} et le VIS_{GOR} n'expriment pas la protéine virale Vpx, et l'apport de cette protéine virale pendant ou avant l'infection par VIH-1 augmente significativement l'infection des cellules myéloïdes par ce virus (Figure 15) (Goujon, Arfi et al. 2008, Berger, Goujon et al. 2009, Kaushik, Zhu et al. 2009), mettant ainsi en évidence le rôle de Vpx dans l'infection virale.

Les mécanismes de régulation de SAMHD1 par la protéine virale Vpx ont été largement étudiés. En effet, il a été montré que la protéine Vpx contrecarre vraisemblablement SAMHD1 par l'interaction avec le domaine C-terminal de SAMHD1 et recrutement d'une ubiquitine E3-ligase afin d'induire la dégradation par le protéasome, ce qui abolit la restriction

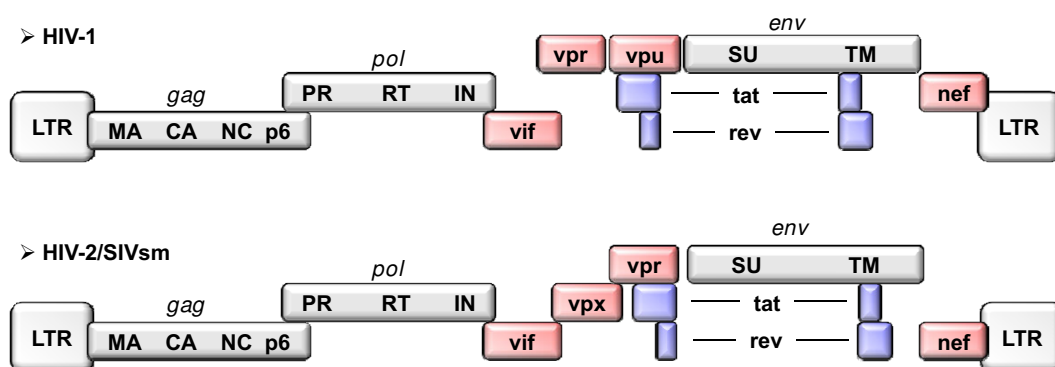


Figure 15. Représentation schématique des génomes du VIH-1 et du VIH-2 (Ayinde, Maudet et al. 2010). Les cases grises représentent les gènes de structure; les cases bleues indiquent les gènes régulateurs; et les cases roses indiquent les gènes accessoires.

médiée par SAMHD1 (Hrecka, Hao et al. 2011, Laguette, Sobhian et al. 2011, Ahn, Hao et al. 2012, Wei, Guo et al. 2012).

II. 2. c. Fonctions cellulaires de SAMHD1

Les mutations au niveau du gène SAMHD1 affectant son activité enzymatique sont associées au syndrome d'Aicardi-Goutières (AGS), une maladie auto-immune encéphalopathique qui touche essentiellement les nourrissons. Le syndrome AGS est caractérisé par des symptômes imitant une infection virale chronique (Aicardi and Goutieres 1984, Lebon, Badoual et al. 1988, Rice, Bond et al. 2009). A ce jour, les mutations au niveau de SAMHD1 sont à l'origine de 13% des cas d'AGS (Crow, Chase et al. 2015). Cette maladie entraîne une production aberrante d'IFN- α , de néoptérine et un recrutement de leucocytes dans le liquide céphalorachidien (Dale, Gornall et al. 2010, Ravenscroft, Suri et al. 2011, Crow 2013, Crow, Chase et al. 2015). De plus, les mutations dans les gènes codants pour les protéines impliquées dans le métabolisme des acides nucléiques, y compris TREX1 (code pour une exonucléase) et SAMHD1, provoquent une accumulation de dNTP intracellulaires, lesquelles sont détectées par les PRR (pattern recognition receptors) et entraînent une réponse immunitaire en absence de pathogènes. Il est donc supposé que SAMHD1 pourrait limiter l'expression des éléments mobiles du génome, via ses deux activités dNTPase et exonucléase, empêchant ainsi l'accumulation de dNTP intracellulaires. Ces données suggèrent que SAMHD1 pourrait avoir un rôle dans la régulation de l'immunité innée et dans le métabolisme des acides nucléiques.

De plus, les patients AGS présentant des mutations dans le gène SAMHD1 développent une forme sévère de la maladie, se traduisant par des signes de lupus érythémateux avec de nombreux symptômes imitant ceux de l'infection par le VIH-1 (Kaliyadan 2008, Rice, Bond et al. 2009) et des problèmes vasculaires pouvant causer des accidents vasculaires cérébraux (Ramesh, Bernardi et al. 2010, Xin, Jones et al. 2011), suggérant un rôle de SAMHD1 dans l'homéostasie vasculaire.

Par ailleurs, il a été montré que la dérégulation de SAMHD1 a un impact sur le cycle cellulaire car la diminution de son expression ralentit la prolifération de la cellule, ce qui provoque une accumulation de cellules en phase G1 empêchant la transition G1/S (Franzolin,

Pontarin et al. 2013, Kretschmer, Wolf et al. 2015), un déséquilibre de dNTP en même temps qu'une forte augmentation de dGTP (Franzolin, Pontarin et al. 2013) et s'accompagne d'une induction d'inhibiteurs du cycle cellulaire tels que P16 et P21 (Kretschmer, Wolf et al. 2015). Le groupe de Lee-Kirsch a montré que les fibroblastes de patients AGS présentaient des dommages d'ADN chroniques et des foci d'hétérochromatine dans le noyau qui entraînent des retards de progression du cycle accompagnés d'une sénescence cellulaire (Kretschmer, Wolf et al. 2015). La sénescence est un état d'arrêt permanent du cycle cellulaire qui représente une réponse au stress cellulaire pouvant être induite par divers stimuli extrinsèques et intrinsèques, notamment des dommages à l'ADN (Campisi and d'Adda di Fagagna 2007).

D'autres phénomènes tels que des délétions dans l'ADN mitochondrial ont été observées chez des patients dont le gène SAMHD1 a subi des mutations, suggérant que SAMHD1 pourrait jouer un rôle dans l'homéostasie cellulaire (Leshinsky-Silver, Malinger et al. 2011).

Toutes ces données suggèrent que SAMHD1 joue divers rôles importants, comprenant la modulation du cycle cellulaire, la régulation de réponses immunitaires innées et le contrôle de l'homéostasie cellulaire.

III. Persistance du virus et réservoirs viraux

III. 1. La persistance virale

Bien que les thérapies antirétrovirales c-ART soient très efficaces pour réduire la morbidité et la mortalité liée au VIH-1 (Palella, Delaney et al. 1998) et épargner ainsi des millions de vies (Walensky, Paltiel et al. 2006), c-ART ne parvient pas à l'éradication complète du virus de l'organisme (Richman, Margolis et al. 2009, International, Deeks et al. 2012). En effet, c-ART inhibe considérablement la réplication du VIH-1 et permet de réduire la charge virale plasmatique à des niveaux indétectables (Chun, Carruth et al. 1997, Finzi, Hermankova et al. 1997, Perelson, Essunger et al. 1997, Wong, Hezareh et al. 1997) mais dès lors que le traitement est interrompu, un rebond viral rapide est observé chez de nombreux individus (Figure 16) (Davey, Bhat et al. 1999). Ce rebond de charge virale est la preuve incontestable de la persistance du virus et de la mise en place d'un réservoir pour le VIH-1 malgré les traitements c-ART (Davey, Bhat et al. 1999, Kulpa and Chomont 2015).

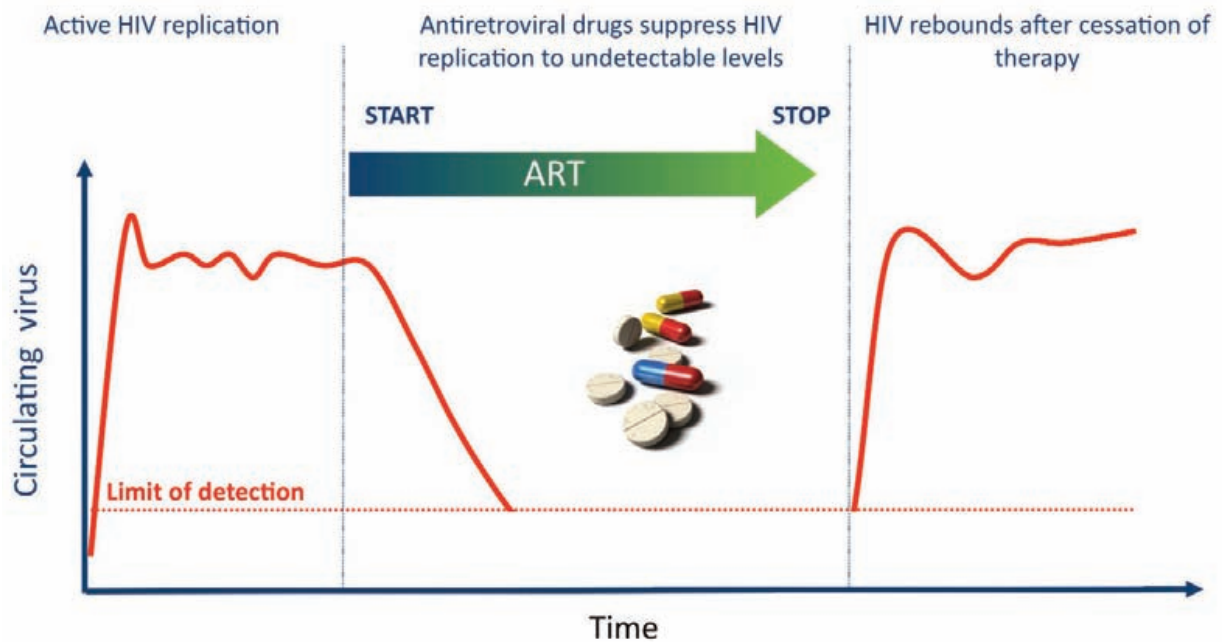


Figure 16. Définition du réservoir du VIH-1 (Kulpa and Chomont 2015). Une infection par le VIH-1 non traitée se caractérise par des taux élevés de réplication virale pouvant être mesurés dans le plasma des personnes infectées par le VIH-1. La thérapie c-ART réduit la réplication virale à des niveaux indétectables par des mesures de charge virale. Lorsque le traitement antirétroviral c-ART est interrompu, la réplication du VIH-1 reprend, révélant que le VIH-1 persistait dans les «réservoirs» cellulaires et anatomiques au cours c-ART et que ces réservoirs pouvaient réenclencher l'infection.

De ce fait, malgré la mise sous traitement, le virus persiste dans des réservoirs cellulaires et anatomiques tout au long de la vie des individus infectés. Ces réservoirs se définissent essentiellement par : des cellules/tissus infectés contenant du génome viral inductible et qui sont capables de produire du virus infectieux avec une cinétique de renouvellement plus lente (Blankson, Persaud et al. 2002, Chun, Justement et al. 2007, Eriksson, Graf et al. 2013) et sont impliqués dans la maintenance à long terme du virus dans l'organisme (Figure 17) (Chun, Engel et al. 1998, Persaud, Zhou et al. 2003).

Deux mécanismes majeurs ont été décrits comme contribuant à la persistance du VIH-1. Le premier mécanisme consiste en la mise en place précoce d'un petit pool de cellules infectées de manière latente, de longue durée de vie, pouvant être réactivées pour assurer le maintien du virus pendant des décennies (Siliciano, Kajdas et al. 2003, Chomont, El-Far et al. 2009). Le second mécanisme se caractérise par la capacité du VIH-1 à continuer à se répliquer à de faibles niveaux (réplication virale résiduelle) dans des réservoirs anatomiques inaccessibles aux molécules antirétrovirales (Fletcher, Staskus et al. 2014).

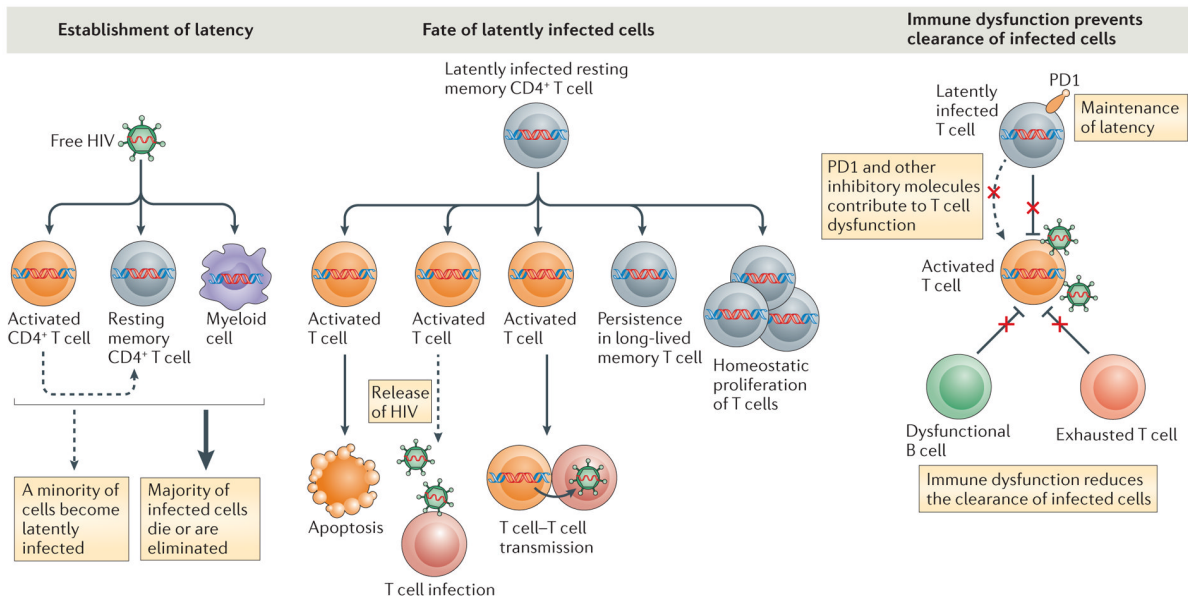


Figure 17. Les mécanismes de la persistance du VIH-1 au cours du traitement antirétroviral c-ART (International, Deeks et al. 2012). (Gauche) Le mécanisme principal de l'établissement de la latence est probablement l'infection des lymphocytes T CD4⁺ activées. La plupart de ces cellules meurent, mais une minorité retourne à un état de latence. **Centre-** Le sort de ces lymphocytes T CD4⁺ mémoires "latents" peut être la mort par apoptose, ou deviennent une source de nouvelles infections, persistent sous forme de cellules à longue durée de vie ou se développent par des mécanismes d'homéostasie. **(Droite)** Les mécanismes immunitaires contribuant à la persistance du virus incluent des mécanismes qui maintiennent les cellules dans un état de latence (Surexpression de PD-1) ainsi que le dysfonctionnement immunitaire inefficace à l'élimination des cellules infectées.

De plus, de multiples mécanismes encore mal définis contribuent à un état persistant du dysfonctionnement immunitaire accompagné de l'incapacité des réponses immunitaires à reconnaître et à éliminer de manière efficace les cellules infectées. De tels mécanismes comprennent la fibrose tissulaire lymphoïde, une perte irréversible de l'intégrité de la muqueuse intestinale, une fréquence supérieure à la normale de lymphocytes T activés, une charge insoutenable de coinfections et une perte de cellules immunorégulatrices (Brenchley, Price et al. 2006, Zeng, Smith et al. 2011). Des niveaux élevés d'inflammation tissulaire et d'activation des cellules immunitaires pourraient, à leur tour, augmenter le nombre de cellules susceptibles à l'infection (Chun, Nickle et al. 2005) et aussi augmenter la prolifération homéostatique de cellules infectées de manière latente (Chomont, El-Far et al. 2009). De ce fait, l'inflammation non résolue observée chez la majorité des personnes sous c-ART peut contribuer au maintien d'un réservoir stable pour le VIH-1 en favorisant les deux mécanismes de persistance susmentionnés (Hatano, Jain et al. 2013, Cockerham, Siliciano et al. 2014).

III. 2. Le réservoir latent et le réservoir actif

De manière générale, le réservoir viral est défini comme étant un groupe de cellules ou un site anatomique dans lequel le génome du virus s'intègre, persiste et forme un réservoir proviral cellulaire compétent et extrêmement stable, produisant peu ou pas de virus ni d'antigènes viraux, et protégé de l'attaque par le système immunitaire et de l'effet cytopathique du VIH-1 (Blankson, Persaud et al. 2002, Ruelas and Greene 2013). Ce réservoir cellulaire se caractérise par une cinétique de renouvellement considérablement lente (Blankson, Persaud et al. 2002).

Le réservoir latent a été identifié dans un petit groupe de lymphocytes T CD4⁺ quiescents capables de persister chez des individus sous traitement c-ART avec des charges virales indétectables (Finzi, Blankson et al. 1999, Kulpa and Chomont 2015), et de produire du virus infectieux suite à une activation cellulaire. Tout comme il a été montré que la demi-vie moyenne de ce réservoir latent était très longue (43,9 mois) et que son éradication pouvait prendre jusqu'à 60 ans (Finzi, Blankson et al. 1999). A ce jour, deux mécanismes peuvent expliquer l'infection latente des lymphocytes T CD4⁺ quiescents : Le VIH-1 peut soit directement infecter les lymphocytes T CD4⁺ quiescents (Swiggard, Baytop et al. 2005, Cameron, Saleh et al. 2010), ou alors infecter des lymphocytes T CD4⁺ mémoires activés qui parviennent par la suite à échapper à la mort cellulaire pour finalement revenir à un état de quiescence (Bosque and Planelles 2009). Une fois que ces cellules sont infectées, la latence du VIH-1 est enclenchée via divers mécanismes, notamment l'intégration de l'ADN du VIH-1 dans les LT CD4⁺ quiescents qui, le plus souvent, se fait en régions sous-optimales pour l'expression génique provirale - expression génique virale faible en efficacité après l'intégration- et non pas dans des régions activement transcrites (Brady, Agosto et al. 2009). La suppression des facteurs de transcription dans les LT CD4⁺ quiescents et les faibles taux de transactivateurs de la protéine d'expression génique du VIH-1 de ces cellules s'avèrent également importants (Pan, Baldauf et al. 2013). De plus, la transcription du VIH-1 peut être bloquée par une hyperméthylation de l'ADN et à la modification des histones et de l'ADN dans les séquences LTR du VIH-1 (Kauder, Bosque et al. 2009).

En cours de traitement c-ART, la fréquence des lymphocytes T CD4⁺ ayant intégré un ADN de VIH-1 est associée à la fréquence de prolifération des lymphocytes T CD4⁺ mesurée par Ki67 (Chomont, El-Far et al. 2009). La relation directe entre la prolifération des LT et la

persistance du VIH-1 a récemment été rapportée par deux études fondamentales menées par les groupes de Hughes et Frenkel. Ces deux travaux ont identifié des sites spécifiques d'intégration du VIH-1 liés à l'expansion clonale des cellules infectées par le VIH-1. Les intégrations de provirus ont été fréquemment trouvées dans des gènes associés aux cancers ou à la régulation du cycle cellulaire, favorisant l'infection des cellules en prolifération et la persistance des cellules infectées en prolongeant leur survie (Maldarelli, Wu et al. 2014, Wagner, McLaughlin et al. 2014). Ces deux études ont d'avantage appuyé le concept de prolifération en tant que mécanisme de persistance virale dans les lymphocytes T CD4⁺ mémoire du sang périphérique et des tissus lymphoïdes (von Stockenström, Odevall et al. 2015).

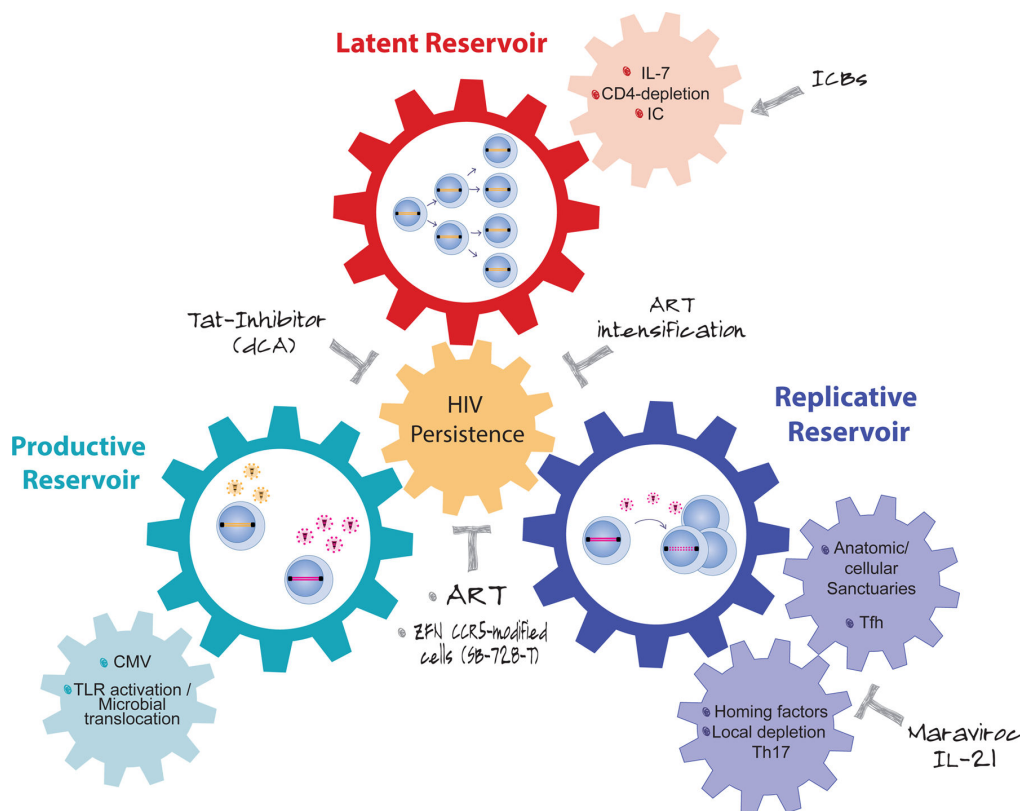


Figure 18. Représentation schématisée des différents mécanismes contribuant à la persistance du VIH-1 (Massanella, Fromentin et al. 2016). Chez les individus infectés par le VIH-1 et sous traitement c-ART, le réservoir latent (roue rouge) est maintenu par prolifération continue de cellules infectées de manière latente, pouvant produire des particules virales lors de l'activation constituant le réservoir productif (roue turquoise). Lorsque des cellules réactivées se trouvent dans des sanctuaires anatomiques / cellulaires, où les molécules antirétrovirales ne peuvent pas diffuser efficacement, des niveaux résiduels de réplication virale peuvent se produire (roue bleue), alimentant continuellement le réservoir latent. Des niveaux accrus d'activation immunitaire et / ou d'inflammation favorisent ces trois mécanismes de persistance du VIH-1 (petites roues). Plusieurs stratégies thérapeutiques conçues pour agir directement sur la production / réplication virale ou pour moduler les cellules immunitaires pourraient être utilisées pour interrompre ce cercle vicieux.

Plusieurs compartiments anatomiques tels que la muqueuse intestinale (Brenchley, Hill et al. 2004, Brenchley, Schacker et al. 2004, Chun, Nickle et al. 2008, Sheth, Chege et al. 2008, Yukl, Gianella et al. 2010), le tractus génital (Deleage, Moreau et al. 2011), les ganglions lymphatiques (Pantaleo, Graziosi et al. 1993, Rothenberger, Keele et al. 2015) et le système nerveux central se sont révélés enrichis en cellules infectées par le VIH-1 (North, Higgins et al. 2010). Les concentrations des antirétroviraux dans certains de ces tissus se sont révélées inférieures à celles observées dans le sang périphérique, même chez des individus traités (Kim, Fromm et al. 1998, Fletcher, Staskus et al. 2014), ce qui indique qu'il y a établissement d'une répllication active et persistante dans ces tissus, malgré une charge virale indétectable dans le sang du fait des traitement c-ART.

Cette répllication résiduelle du VIH-1 dans ces sanctuaires anatomiques et la dissémination hétérogène de molécules antirétrovirales entre les tissus d'un même individu (Thompson, Bokhart et al. 2015) peuvent induire l'activation des cellules présentes localement, les rendant ainsi plus permissives à l'infection par le VIH-1 (Biancotto, Iglehart et al. 2008), et favoriser la transmission du VIH-1 de cellule à cellule (Figure 18) (Sigal, Kim et al. 2011). Ces mécanismes assurent une constitution lente mais continue des réservoirs viraux et permettent de continuellement reconstituer le réservoir latent chez les individus sous traitement c-ART tout en maintenant une répllication active du virus mais à bas-bruit (Chun, Nickle et al. 2005, Chun, Justement et al. 2007, Yukl, Shergill et al. 2010, Sigal and Baltimore 2012).

III. 3. L'établissement du réservoir : Quand ? Comment ?

A ce jour, l'existence d'un réservoir viral est reconnue comme le principal obstacle à l'éradication du VIH-1 (Richman, Margolis et al. 2009). Une mise sous traitement c-ART précoce s'est avérée insuffisante pour empêcher l'établissement d'un réservoir viral. En effet, le réservoir est établi entre 48 et 72 heures après l'infection, a une longue demi-vie (Siliciano, Kajdas et al. 2003, Crooks, Bateson et al. 2015) et provoque un rebond viral lorsque le traitement c-ART est interrompu (Murray, Kwon et al. 2016). Des travaux menés sur le modèle primate non humain ont montré que l'initiation de traitement c-ART dès le troisième jour post-infection ne pouvait pas empêcher la mise en place d'un réservoir viral, la preuve étant le rebond viral observé après interruption du traitement c-ART (Whitney, Hill et al. 2014). D'autre part, une étude chez l'homme a montré que l'initiation du traitement c-ART

seulement 10 jours après l'apparition des symptômes de la primo-infection n'empêche pas la génération de lymphocytes T CD4⁺ infectés de manière latente (Chun, Engel et al. 1998). L'établissement du réservoir étant inévitable, plusieurs travaux indépendants ont néanmoins démontré qu'une initiation rapide des antirétroviraux juste après l'infection pouvait réduire la taille du réservoir du VIH-1 (Strain, Little et al. 2005, Archin, Vaidya et al. 2012, Buzon, Martin-Gayo et al. 2014, Ananworanich, Dube et al. 2015). La période requise pour le déclenchement du rebond viral après l'interruption du traitement c-ART est en corrélation avec la virémie totale au cours de l'infection aiguë et avec l'ADN proviral détecté au moment de l'arrêt du traitement c-ART (Williams, Hurst et al. 2014). La mise précoce sous traitement c-ART semble donc une stratégie thérapeutique favorable à la réduction de la taille du réservoir.

Le réservoir s'établit par l'intégration de l'ADNc du VIH-1 dans le génome cellulaire. Cependant, différentes formes d'ADN du VIH-1 ont été isolées dans les sous populations de LT CD4⁺. L'ADN du VIH-1 se présente sous forme intégrée et non intégrée telle que le complexe de préintégration linéaire et les cycles de répétition terminale 1 (LTR) et 2-LTR. La grande majorité des lymphocytes T CD4⁺ infectés contiennent une molécule d'ADN VIH-1 (Josefsson, King et al. 2011), mais tous les ADN VIH-1 intégrés ne constituent pas forcément une source de virus capable de se répliquer après réactivation cellulaire (Rouzioux and Richman 2013). Une étude récente a suggéré que le nombre de cellules T CD4⁺ quiescentes, qui contiennent de l'ADN viral défectueux peut être considérablement plus élevé que le nombre de cellules infectées capables de produire un virus compétent pour la réplication après l'activation cellulaire (Eriksson, Graf et al. 2013). Les expériences de réactivation virale définissent formellement la capacité de cellules infectées à produire un virus actif capable d'assurer la propagation de l'infection. La quantification des ARN du VIH-1 épissés et non épissés peut constituer un marqueur des cellules productives, mais encore faut-il que la transcription se traduise par la production de virions (Schmid, Gianella et al. 2010). Le réservoir s'établit donc par l'infection active de lymphocytes T CD4⁺ capables de produire un virus compétent pour la réplication et capable d'engendrer un rebond viral après interruption de traitement c-ART.

III. 4. Les réservoirs cellulaires

Le VIH-1 infecte de nombreuses cellules myéloïdes et lymphoïdes conférant suivant leur lieu de résidence et leur capacité de migration, des niveaux de réservoirs variables entre les différents compartiments tissulaires et cellulaires.

III. 4. a. Les lymphocytes T CD4⁺

Un grand nombre d'études décrit les lymphocytes T CD4⁺ comme le principal réservoir cellulaire du VIH-1. Le VIH-1 peut persister dans plusieurs sous-types de lymphocytes T CD4⁺, définis en fonction de leurs propriétés fonctionnelles (Gosselin, Monteiro et al. 2010, Monteiro, Gosselin et al. 2011, Wacleche, Goulet et al. 2016), et de leur stade de différenciation (Chomont, El-Far et al. 2009, Buzon, Sun et al. 2014, Jaafoura, de Goer de Herve et al. 2014). Les lymphocytes T CD4⁺ mémoires quiescents sont la forme de réservoir du VIH-1 qui a été la plus étudiée et l'infection latente de ces cellules est expliquée par la physiologie des lymphocytes T. En effet, il existe une relation entre l'état d'activation du lymphocyte T CD4⁺ infecté et sa capacité à produire du virus.

La susceptibilité à l'infection et le potentiel réservoir varie selon les sous-populations de lymphocytes T CD4⁺. L'expression différentielle de CCR7, un récepteur de chimiokines médian le trafic dans les ganglions lymphatiques (Campbell and Butcher 2000), associé à CD45RA, un récepteur lié à la protéine tyrosine phosphatase (Altin and Sloan 1997), identifie des sous-populations de lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺, incluant les cellules naïves (CCR7⁺CD45RA⁺), mémoires centrales (CCR7⁺CD45RA⁻) et mémoires effectrices (CCR7⁻CD45RA⁻) (Sallusto, Lenig et al. 1999).

III. 4. a. 1. Les cellules naïves, effectrices et mémoires

En cas d'infection par le VIH-1, une expansion clonale des cellules naïves est induite par la rencontre avec l'antigène et permet en fonction des cytokines produites par le système immunitaire inné d'engager leur différenciation. Les lymphocytes T CD4⁺ naïfs, qui n'ont encore jamais rencontré d'antigène spécifique (Wightman, Solomon et al. 2010), ont été décrits comme étant peu permissifs à l'infection par le VIH-1 (Baldanti, Paolucci et al. 2001, Fabre-Mersseman, Dutrieux et al. 2011) et très peu de séquences virales ont pu être détectées

lors d'expériences d'expansion clonale des cellules naïves (Wightman, Solomon et al. 2010, von Stockenström, Odevall et al. 2015). Les cellules effectrices, de courte durée de vie, sont induites suite au contact avec un antigène spécifique. Une petite fraction de ces cellules effectrices se différencie en cellules T mémoires de longue durée de vie. Le développement de cellules T mémoires est un programme linéaire au cours duquel une cellule mémoire très immature transite progressivement vers des stades plus matures et différenciés.

Selon leur état de différenciation, on distingue les sous-populations lymphocytaires T mémoires suivantes: lymphocyte T Mémoire Souche (T_{SCM}), T Centrale Mémoire (T_{CM}), T Transitionnelle Mémoire (T_{TM}), T Effectrice Mémoire (T_{EM}), T Résidente Mémoire (T_{RM}) et T Terminale Différenciée (T_{TD}), distingués en fonction de leur localisation et de leur propriétés fonctionnelles. Identifiés en 2011, les lymphocytes T $CD4^+$ mémoires souches (T_{SCM}), à longue durée de vie, représentent le stade le moins différencié d'un lymphocyte T mémoire (Gattinoni, Lugli et al. 2011, Cieri, Camisa et al. 2013). Permissifs à l'infection par le VIH-1, les lymphocytes T_{SCM} présentent des quantités d'ADN proviral du VIH-1 supérieures à celle détectée dans chacune des cellules T $CD4^+$ naïves, T_{CM} , T_{EM} et T_{TD} (Buzon, Sun et al. 2014). Ces cellules sont dotées d'une forte capacité d'auto-renouvellement homéostatique et de ce fait, elles sont considérées comme le principal contributeur stable au réservoir durable du VIH-1, malgré leur présence minoritaire dans le pool des lymphocytes T mémoires circulants (Buzon, Sun et al. 2014, Jaafoura, de Goer de Herve et al. 2014). Les lymphocytes T_{SCM} peuvent se différencier en cellules T_{EM} qui sont fortement représentés dans le sang périphérique et sont considérés comme le principal réservoir du virus en raison de leur capacité de prolifération, leur capacité à produire du virus après réactivation et de leur durée de vie relativement longue. Ces cellules sont également caractérisées par leur capacité de migration préférentielle dans les organes lymphoïdes (Chomont, El-Far et al. 2009). Les T_{TM} sont un stade intermédiaire entre les T_{CM} et T_{EM} , caractérisés par l'expression de la molécule CCR5. L'ADN du VIH-1 isolé de cette fraction T_{TM} est moins capable de se répliquer comparé à celui isolé des T_{CM} , suggérant un excès de virus défectueux dans cette sous-population cellulaire (Soriano-Sarabia, Bateson et al. 2014). Les lymphocytes T effecteurs mémoires (T_{EM}) sont caractérisés par leur capacité à rapidement initier une réponse effectrice et à migrer vers les tissus non lymphoïdes. Ces cellules ont un potentiel de prolifération plus marqué et une durée de vie plus courte que les autres fractions de cellules mémoires.

Plusieurs travaux ont étudié la contribution relative de chaque sous-population de LT CD4⁺ mémoires au réservoir et ont mesuré le taux d'ADN viral dans les différentes sous-populations de LT CD4⁺. Les groupes de Palmer et de Wong ont montré que les LT T_{EM} et T_{TM} présentaient les niveaux les plus hauts d'ADN VIH-1 (Yukl, Shergill et al. 2013, von Stockenstrom, Odevall et al. 2015) tandis que le groupe de Sékaly a identifié les T_{CM} et T_{TM} comme les principaux réservoirs cellulaires du VIH-1 (Chomont, El-Far et al. 2009). De manière générale, les LT T_{EM}, T_{CM} et T_{TM} contiennent toujours des niveaux plus élevés de VIH-1 comparés aux les lymphocytes T naïfs. La contribution relative de chaque sous-population mémoire semble varier également selon le délai de mise sous traitement c - ART et leur localisation lorsque les sous-populations ont été isolées des tissus (Yukl, Shergill et al. 2013, von Stockenstrom, Odevall et al. 2015). Le potentiel réplicatif des formes virales infectant ces cellules reste à définir. Néanmoins, Soriano-Sarabia a révélé en 2014 que les lymphocytes T CD4⁺ T_{CM} contenaient le plus haut niveau de virus inducible capable de se répliquer, suivis par les lymphocytes T CD4⁺ T_{TM} et T naïfs (Soriano-Sarabia, Bateson et al. 2014).

III - 4. a. 2. La différenciation fonctionnelle : Tfh, Treg, Th17 et CCR6⁺

D'un point de vue fonctionnel, les lymphocytes T CD4⁺ peuvent être classés par rapport à leurs caractéristiques fonctionnelles, notamment des propriétés antimicrobiennes spécifiques, des profils de sécrétion de cytokines distincts et des capacités de migration. Sur la base de ces critères, des sous-populations de lymphocytes T présentant les polarisations fonctionnelles suivantes ont été distinguées: Th1 (défense immunitaire anti-bactérienne), Th2 (protection immunitaire contre les helminthes et autres parasites), Th17 (immunité contre les infections bactériennes et fongiques extracellulaires), Th9 (régulation de l'inflammation allergique, immunité anti-tumorale), lymphocytes T régulateurs Treg (ajustement, modulation et régulation de l'activité immunitaire anti-microbienne) et lymphocytes T auxiliaires folliculaires Tfh (support de l'immunité humorale). Les lymphocytes T CD4⁺ Tfh, Th17 et Tregs ont été identifiés comme des réservoirs cellulaires préférentiels pour le VIH-1 chez les individus avec une charge virale indétectable (Tran, de Goer de Herve et al. 2008, Lindqvist, van Lunzen et al. 2012, Perreau, Savoye et al. 2013).

Les Tfh et les Treg

Les lymphocytes Tfh sont principalement situés dans différents tissus lymphoïdes secondaires (ganglions lymphatiques, rate, amygdales, plaques de Peyer) (Ma, Deenick et al. 2012) et représentent des cibles d'infection par le VIH-1 et un important réservoir pour le virus (Perreau, Savoye et al. 2013, Banga, Procopio et al. 2016). À la suite de leur découverte au début des années 2000, les cellules Tfh dans le contexte de l'infection par le VIH-1 ont fait l'objet d'intenses investigations. Ces cellules forment un réservoir important lors d'une infection par le VIH-1 (Miles and Connick 2016, Vinuesa, Linterman et al. 2016) et leur expansion dans les ganglions lymphatiques est en corrélation avec la virémie (Perreau, Savoye et al. 2013).

Il est important de noter que les lymphocytes Tfh présentent les taux les plus élevés d'ADN et d'ARN du VIH-1 comparé à toutes les autres sous-populations de lymphocytes T CD4⁺ dans les ganglions lymphatiques, et qu'ils sont capables de produire, après réactivation, des virions compétents pour la réplication et l'infection (Petrovas, Yamamoto et al. 2012, Perreau, Savoye et al. 2013, Xu, Weatherall et al. 2013, Kohler, Pham et al. 2016). De plus, il a été démontré que les cellules Tfh triées étaient très susceptibles à l'infection par le VIH-1 in vitro (Perreau, Savoye et al. 2013, Ruffin, Brezar et al. 2015). Des altérations importantes de la dynamique des lymphocytes T CD4⁺ Tfh ont été décrites dans l'infection par le VIH-1. Ces cellules sont déplétées en phase aiguë de l'infection (Moukambi, Rabezanahary et al. 2015) tandis qu'en phase chronique, leur nombre est plus élevé que chez les personnes non-infectées (Lindqvist, van Lunzen et al. 2012, Petrovas, Yamamoto et al. 2012, Xu, Weatherall et al. 2013), avant de diminuer au stade SIDA (Vazquez, Rekka et al. 2012, Xu, Wang et al. 2015). Cependant, la mise sous traitement c-ART induit la normalisation du nombre de cellules Tfh chez les individus infectés (Perreau, Savoye et al. 2013) et aucune différence dans leur proportion n'est observée chez des individus traités et contrôlés comparés à des individus non-infectés par le VIH-1 (Lindqvist, van Lunzen et al. 2012, Ruffin, Brezar et al. 2015). Ces cellules se caractérisent par l'expression du récepteur de chimiokine CXCR5, PD-1, ICOS et la sécrétion d'IL-21, et expriment le facteur de transcription Bcl-6 crucial à leur développement (Crotty 2011). Grâce à leur interaction avec les lymphocytes B, ces cellules jouent un rôle crucial dans la maturation d'affinité des anticorps et dans la différenciation des LB folliculaires en LB mémoires et cellules plasmiques. Une autre population de Tfh a été identifiée dans le

sang périphérique (pTfh), permissive elle aussi à l'infection par le VIH-1 et capable de produire du virus suite à une réactivation. Cette fraction de pTfh est identifiée seulement par son expression du récepteur aux chimiokines CXCR5 (Pallikkuth, Sharkey et al. 2015).

Les lymphocytes T régulateurs (Treg) sont eux aussi sensibles à l'infection par le VIH-1 et contribuent au réservoir viral chez les individus infectés et traités efficacement (Andersson, Boasso et al. 2005, Tran, de Goer de Herve et al. 2008). Les Treg jouent un rôle essentiel dans le contrôle de l'activation immunitaire et l'établissement et le maintien de la tolérance et l'homéostasie immunitaire (Rosenberg, Billingsley et al. 1997, McMichael, Borrow et al. 2010). Ces cellules sont également impliquées dans le contrôle de la prolifération et la production de cytokines par les lymphocytes T effecteurs (Rudensky 2011, Soghoian, Jessen et al. 2012).

Les cellules Treg se distinguent par une forte expression de CD25 (IL-2R α) et du facteur de transcription FoxP3 (Fontenot, Gavin et al. 2003, Hori, Nomura et al. 2003, Sakaguchi 2004). Bien que leur facteur de transcription FoxP3 soit la référence des cellules Treg chez la souris (Sakaguchi, Miyara et al. 2010, Tang and Bluestone 2013), chez l'homme, son expression au cours de l'activation peut être augmenté dans les LT CD4+ effectrices. Le groupe de Fazekas de St Groth a montré en 2006 que les cellules Treg humaines pouvaient être identifiées par la faible expression de CD127 (IL-7 α) à leur surface (Seddiki, Santner-Nanan et al. 2006). Ces cellules expriment également des marqueurs associés à une fonction régulatrice, tels que CTLA-4 et GITR (protéine liée au TNFR induite par les glucocorticoïdes) (Read, Malmstrom et al. 2000, McHugh, Whitters et al. 2002, Miyara, Gorochov et al. 2011) et sont éliminées en phase aiguë de l'infection par le VIH-1 dans l'intestin (Chase, Sedaghat et al. 2007) ce qui réduit l'activité suppressive localement.

Les lymphocytes T CD4⁺ CCR6⁺ et les Th17

Des études pionnières menées par Sallusto ont démontré que les récepteurs de chimiokines sont des marqueurs de sous-populations de cellules T dotées de caractéristiques fonctionnelles distinctes (Sallusto 2016). En 2004, les récepteurs de chimiokines CXCR3 et CCR4 ont été identifiés comme étant préférentiellement exprimés par les cellules Th1 et cellules Th2, respectivement (Rivino, Messi et al. 2004). Le CXCR3 intervient dans la migration cellulaire

vers les sites inflammatoires alors que le CCR4 est un marqueur de migration vers la peau (Reiss, Proudfoot et al. 2001, Woodland and Kohlmeier 2009). En 2007, deux ans après l'identification officielle des cellules Th17 (Harrington, Hatton et al. 2005, Park, Li et al. 2005), le récepteur de chimiokine CCR6 a été identifié comme le principal marqueur caractérisant la lignée Th17 (Acosta-Rodriguez, Rivino et al. 2007, Singh, Zhang et al. 2008, Abromson-Leeman, Bronson et al. 2009). Le CCR6 régule le trafic des Th17 dans l'intestin (Wang, Kang et al. 2009) et d'autres sites anatomiques tels que le cerveau (Sallusto, Impellizzieri et al. 2012). L'expression différentielle de CCR4, CCR6 et CXCR3 distingue des sous-populations de cellules Th17 avec différentes fonctionnalités. En effet, la co-expression de CCR6 et CCR4 identifie les cellules Th17 humaines qui produisent l'IL-17A et prolifèrent en réponse à *Candida albicans* et *Staphylococcus aureus* (Acosta-Rodriguez, Rivino et al. 2007, Zielinski, Mele et al. 2012). La co-expression de CCR6 et CXCR3 identifie une population hétérogène, appelée Th1Th17 (Acosta-Rodriguez, Rivino et al. 2007). Ces cellules Th1Th17, également appelées cellules Th1 non classiques, expriment les facteurs de transcription ROR- γ et T-bet et constituent une fraction majeure des cellules Th1 produisant de l'IFN- γ , et enfin une fraction mineure de cellules coproduisant IL-17A et IFN- γ (Acosta-Rodriguez, Rivino et al. 2007, Cosmi, Maggi et al. 2014, Becattini, Latorre et al. 2015).

L'infection par le VIH-1 induit une déplétion massive des lymphocytes T CD4⁺, principalement des cellules Th17, dans le tractus gastro-intestinal (Douek, Picker et al. 2003, Brenchley, Schacker et al. 2004), et la perte de ces cellules Th17 contribue à la pathogenèse du VIH-1 (Sandler and Douek 2012, Bixler and Mattapallil 2013). De plus, il a également été rapporté que les cellules Th17 co-exprimant CCR6 et le corécepteur CCR5 du VIH-1 sont préférentiellement déplétées dans le tractus gastro-intestinal et dans le sang périphériques des individus infectés (Brenchley, Paiardini et al. 2008, El Hed, Khaïtan et al. 2010). La déplétion des Th17 est considérée comme une cause majeure de translocation microbienne intestinale menant à une activation immunitaire chronique, à l'apparition d'infections opportunistes et à la progression de la maladie (Sandler and Douek 2012, Klatt, Funderburg et al. 2013, de Repentigny, Goupil et al. 2015). La déplétion massive des Th17 lors de l'infections par le VIH-1 peut être expliquée par divers mécanismes, notamment : l'infection par le VIH-1 (Gosselin, Monteiro et al. 2010, Alvarez, Tuen et al. 2013), l'absence de cytokines polarisantes Th17 (Micci, Cervasi et al. 2012, Bixler and Mattapallil 2013), la

perturbation du trafic des Th17 vers l'intestin (Mavigner, Cazabat et al. 2012, Loiseau, Requena et al. 2016), l'expansion de cellules Tregs (Favre, Lederer et al. 2009, Favre, Mold et al. 2010), et la surexpression de facteurs inhibant la différenciation Th17 (Bixler, Sandler et al. 2013).

Les cellules Th17 sont décrites comme des cellules permissives à la réplication du VIH-1 (Gosselin, Monteiro et al. 2010, Alvarez, Tuen et al. 2013). Il a été démontré que le marqueur CCR6 des Th17 identifie les cellules T CD4⁺ hautement permissives à l'infection par le VIH-1 in vitro et contiennent des niveaux plus élevés d'ADN VIH-1 intégré par rapport à la population CCR6⁻ chez les individus infectés et non traités (El Hed, Khaitan et al. 2010, Gosselin, Monteiro et al. 2010, Monteiro, Gosselin et al. 2011, Bernier, Cleret-Buhot et al. 2013, Gosselin, Wiche Salinas et al. 2017, Planas, Zhang et al. 2017). Des études récentes ont montré qu'une fraction de cellules Th17 pouvait avoir des durées de vie relativement longues et contribuer à la persistance du réservoir (Sun, Kim et al. 2015, Wacleche, Goulet et al. 2016). Les études de Sun et al. ont démontré que les réservoirs d'ADN du VIH-1 dans les cellules Th17 et Th1Th17 sont restés stables pendant une longue période (plus de 50 mois) chez les sujets infectés et sous c-ART (Sun, Kim et al. 2015), indiquant la contribution importante de ces sous-groupes dans la persistance du VIH-1.

Récemment, deux sous-populations de cellules Th17 ont été caractérisées par le groupe d'Ancuta: les Th17 co-exprimant ou non les deux récepteurs de chimiokines CXCR3 et CCR4 sont appelées doubles négatifs (CCR6⁺DN; CXCR3⁻CCR4⁻) et doubles positifs (CCR6⁺DP; CXCR3⁺CCR4⁺) (Wacleche, Goulet et al. 2016). Cette étude a montré que les cellules CCR6⁺DN sont capables de produire de l'IL-17A à des niveaux similaires à ceux produits par les cellules Th17, tandis que les cellules CCR6⁺DP produisent de faibles niveaux d'IL-17A. De plus, ces deux populations CCR6⁺DN et CCR6⁺DP produisent des niveaux importants d'IFN- γ . Le profil transcriptionnel a révélé que les cellules CCR6⁺DN expriment des marqueurs de développement précoce de Th17 (IL-17F, STAT3), de migration vers les ganglions lymphatiques (CCR7, CD62L), de Tfh (CXCR5, MYC, TERC) et sont capables de produire l'IL-17F, IL-21 et IL-8 suite à une activation in vitro (Wacleche, Goulet et al. 2016).

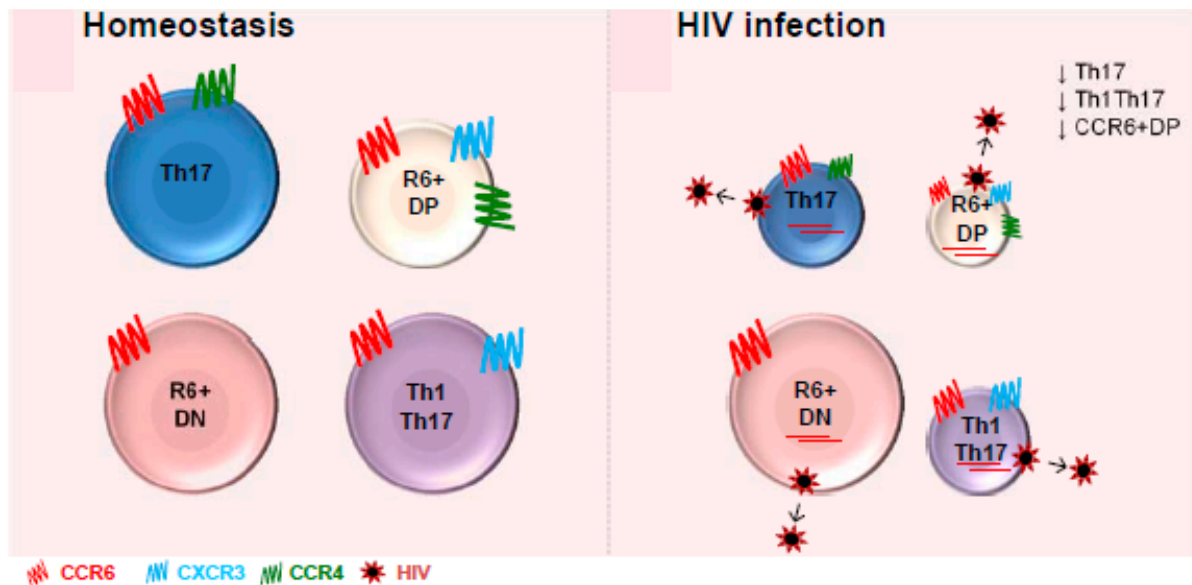


Figure 19. Hétérogénéité des lymphocytes Th17 (Wacleche, Landay et al. 2017). Chez l'homme, quatre sous populations de cellules CCR6⁺ Th17 ont été décrites sur la base de leur niveau d'expression de CCR4 et CXCR3, notamment : Th17 (CCR4⁺CXCR3⁻), Th1Th17 (CCR4⁻CXCR3⁺), CCR6⁺DN (CCR4⁻ CXCR3⁻) et CCR6⁺DP (CCR4⁺CXCR3⁺). **(Gauche)** Chez les individus non infectés par le VIH-1, les cellules Th17, Th1Th17 et CCR6⁺DN sont représentées dans le sang dans les mêmes proportions tandis que les CCR6⁺DP sont moins prédominantes. **(Droit)** Chez les individus infectés par le VIH-1 de manière chronique sous c-ART, les fréquences des Th17, Th1Th17 et CCR6⁺DP sont significativement diminuées. Les CCR6⁺DN préservent quant à elles les mêmes proportions dans le sang périphérique et sont les plus prédominantes dans les ganglions lymphatiques.

Les sous-populations CCR6⁺DN et CCR6⁺DP sont toutes les deux sensibles à l'infection par le VIH-1 in vitro et contiennent des taux relativement élevés d'ADN viral intégré chez les sujets infectés sous traitement c-ART (Wacleche, Goulet et al. 2016) et la réactivation du VIH-1 était préférentiellement observée dans les cellules CCR6⁺DN. Il est important de noter que la fréquence des cellules CCR6⁺DN est préservée chez les individus infectés et traités tandis que toutes les autres sous-populations de cellules CCR6⁺ sont déplétées (Figure 19). Un des mécanismes expliquant la préservation des cellules CCR6⁺DN pourrait inclure l'expression de marqueurs moléculaires spécifiques aux lymphocytes T_{SCM} tels que LEF1, MYC, RORA, STAT3 et TERC, ce qui pourrait les aider à contrer les effets cytopathogènes du virus (Wacleche, Goulet et al. 2016).

Le concept selon lequel des cellules Th17 à longue durée de vie contribuent à la persistance du VIH-1 sous c-ART (Sun, Kim et al. 2015, Wacleche, Goulet et al. 2016) place ces cellules comme un obstacle important à l'éradication du VIH-1. De plus, le fait que les cellules

CCR6⁺DN soient préservées chez les individus chroniquement infectés et traités suggère que cette sous-population représente un facteur majeur de dissémination et de persistance du VIH-1. Les cellules CCR6⁺DN contribuent donc de manière distincte à la pathogenèse du VIH-1 par rapport aux cellules Th17 et Th1Th17 (Wacleche, Goulet et al. 2016).

III. 4. b. Les autres réservoirs potentiels

La mise en évidence de virus plasmatiques différents des virus clonés dans les sous-populations lymphocytaires T CD4⁺ après interruption du traitement a permis la mise en évidence d'autres réservoirs cellulaires, autre que le stock majoritaire établi dans les lymphocytes T CD4⁺ quiescents (Mowat and Viney 1997, Dybul, Daucher et al. 2003, Chomont, El-Far et al. 2009). En effet, des différences de séquences virales ont été observées en comparant les séquences issues du virus émergeant immédiatement après l'arrêt du traitement c-ART et celles issues du réservoir LT CD4⁺ préexistant, suggèrent fortement que d'autres réservoirs pourraient également être impliqués dans le rebond de la réplication du VIH-1 (Chun, Davey et al. 2000, Zhang, Chung et al. 2000). Le même constat a été observé chez des patients traités présentant une charge virale résiduelle qui est en partie liée à la production de virus à partir de réservoir cellulaires autres que les lymphocytes T CD4⁺ quiescents (Sahu, Paar et al. 2009).

L'infection des monocytes et des macrophages par le VIH-1 est un événement fréquent chez les patients infectés par le VIH-1 (Lambotte, Taoufik et al. 2000, Sharkey, Teo et al. 2000). En effet, les macrophages infectés qui sont de longue durée de vie (Kumar, Abbas et al. 2014), sont dispersés dans tous les tissus, organes et compartiments du corps (Koenig, Gendelman et al. 1986, Tschachler, Groh et al. 1987, McElrath, Pruett et al. 1989, Meltzer, Nakamura et al. 1990). Les monocytes précurseurs des macrophages expriment les récepteurs CD4 et CCR5/CXCR4 du VIH-1 et peuvent donc être infectés (Sonza, Maerz et al. 1996). De même, les monocytes en circulation hébergent un provirus infectieux et produisent l'ARN du VIH-1 à n'importe quel stade de la maladie, même en cours de traitement c-ART (Williams, Corey et al. 2001). Les macrophages infectés de manière productive peuvent fusionner avec les lymphocytes T CD4⁺ et transférer le virus dans ces cellules via des synapses virologiques (Crowe, Mills et al. 1990, Sharova, Swingler et al. 2005, Groot, Welsch et al. 2008). Par conséquent, il est concevable que les macrophages représentent également une source de

VIH-1 et un véritable réservoir cellulaire capable de remettre en cause les tentatives d'éradication du virus chez des patients traités par c-ART (Orenstein, Fox et al. 1997).

Le potentiel réservoir des macrophages a été mis en évidence par plusieurs travaux de recherche. Les macrophages sont moins sujets à l'effet cytopathique du VIH-1 (Gendelman, Orenstein et al. 1988, Carter and Ehrlich 2008), les molécules c-ART y pénètrent peu (Perno, Newcomb et al. 1998, Aquaro, Calio et al. 2002) et l'infection a un effet limité sur leur viabilité (Swingler, Mann et al. 2007). Dans les premières phases de la maladie, les cellules de lignées mono-macrophagiques peuvent représenter environ 10% de toutes les cellules infectées productivement et augmenter encore d'avantage lors de la déplétion des LT CD4⁺ (Smith, Meng et al. 2003). En plus de leur rôle important dans l'élimination des débris cellulaires et des agents pathogènes (Kumar and Herbein 2014), les macrophages peuvent également agir comme des cellules présentatrices d'antigène (Ackerman and Cresswell 2004, Koppensteiner, Brack-Werner et al. 2012), jouant ainsi un rôle dans la transmission (Duncan, Russell et al. 2013) et la dissémination du VIH-1 aux LT CD4⁺. De plus, les macrophages infectés libèrent des agents cytotoxiques comme le Fas-L et le TNF- α qui peuvent favoriser l'apoptose des cellules LT CD4⁺ non directement infectés (Badley, Dockrell et al. 1997). Le faible taux d'infectibilité des macrophages peut être attribué à une expression faible de CD4 à leur surface, réduisant ainsi les chances de liaison du virus, mais aussi à des infection abortives pouvant être dues à un défaut de rétro-transcription et d'importation nucléaire (Nicholson, Cross et al. 1986, O'Brien 1994, Diamond, Roshal et al. 2004). Les monocytes/macrophages peuvent persister plusieurs années dans des compartiments comme le système nerveux central (Blankson, Persaud et al. 2002). Ils se concentrent en particulier dans la muqueuse du tube digestif (Mowat and Viney 1997) et jouent un rôle important dans le maintien du réservoir (Crowe, Zhu et al. 2003, Benaroch, Billard et al. 2010).

Les cellules dendritiques expriment peu les récepteurs du VIH-1 (CD4, CXCR4 et CCR5) mais se lient au virus via la lectine DC-sigh à leur surface (Geijtenbeek, Kwon et al. 2000). Les DC plasmacytoïdes localisées dans les muqueuses peuvent être infectées et produire du virus (Cimarelli, Duclos et al. 1995, Aujla, Dubin et al. 2007) tandis que les DC folliculaires présentes dans les centres germinatifs des organes lymphoïdes sont capables de capter un grand nombre de particules virales à leur surface jouant ainsi un rôle de réservoir 2013 (Keele, Tazi et al. 2008, Zhang and Perelson 2013).

Les lymphocytes B peuvent s'infecter après une expression de faibles niveaux de CD4 et de CXCR4 (Moir, Lapointe et al. 1999) et au même titre que les DC, ces cellules peuvent capter le virus à leur surface et le transférer aux lymphocytes T CD4⁺.

Les lymphocytes T CD8⁺ peuvent s'infecter à des fréquences variables conditionnées par les niveaux d'expression du récepteur CD4 qui est faible et fugace dans les différentes phases de leur différenciation (Brooks, Kitchen et al. 2001, Brenchley, Hill et al. 2004, Cochrane, Hughes et al. 2005).

III. 6. Les réservoirs tissulaires

Il existe de plus en plus de preuves de réplication virale résiduelle associée à une virémie de faible niveau chez les patients recevant un traitement suppressif avec une charge virale indétectable en périphérie (Sharkey, Teo et al. 2000, Palmer, Maldarelli et al. 2008, Buzon, Codoner et al. 2011). En cas d'inobservance thérapeutique c-ART, une recrudescence rapide de la virémie se produit entraînant le développement de résistances aux molécules thérapeutiques (Ching, Nielsen-Saines et al. 2010, Angelis, Tateno et al. 2011, Horiike, Iwami et al. 2012). De plus en plus d'études montrent que l'un des nombreux obstacles à la suppression complète des réservoirs viraux serait l'existence de sanctuaires pharmacologiques (à faible diffusion) pour les traitements dont les concentrations, suivants les schémas thérapeutiques, sont insuffisantes pour supprimer complètement la réplication virale dans ces sanctuaires anatomiques du réservoir VIH-1 (Figure 20).

Les ganglions lymphatiques sont définis comme des sanctuaires anatomiques pour le VIH-1 dans lesquels les molécules antirétrovirales sont sub-optimales et de faible diffusion (Fletcher, Staskus et al. 2014, Thompson, Bokhart et al. 2015), ce qui leur permet de maintenir une réplication continue du virus, même si la charge virale est indétectable en périphérie (Fletcher, Staskus et al. 2014).

Les lymphocytes T_{fh} sont hautement permissifs à l'infection par le VIH/SIV (Fukazawa, Lum et al. 2015) et se multiplient continuellement dans les ganglions lymphatiques pendant la phase chronique de l'infection (Lindqvist, van Lunzen et al. 2012, Perreau, Savoye et al. 2013), maintenant ainsi le foyer de réplication. Les cellules dendritiques peuvent également jouer un rôle de réservoir dans les ganglions lymphatiques par transfert des particules virales

présentées à leur surface aux lymphocytes T CD4⁺ (Burton, Keele et al. 2002). La présence de cellules productrices d'ARN VIH-1 dans les ganglions lymphatiques avant l'interruption du traitement c-ART suggère une réplication continue du VIH-1 au niveau tissulaire. De plus, lors du rebond viral qui suit l'interruption du traitement c-ART, la présence de diverses populations de virus suggère que la population virale à l'origine du rebond proviendrait de sources multiples, y compris des ganglions lymphatiques (Rothenberger, Keele et al. 2015). De même, les résultats du groupe d'Igarashi ont montré que les ganglions lymphatiques et les autres tissus lymphoïdes sont les principaux responsables du rebond viral observé après l'interruption du traitement c-ART chez les animaux infectés par le SIV (Horiike, Iwami et al. 2012).

Le groupe de McGrath a séquencé de multiples quasi-espèces d'ARN et d'ADN du VIH-1 isolées en post mortem des ganglions lymphatiques, du cerveau et d'autres tissus chez des sujets dont la charge virale était indétectable au moment du décès (Lamers, Rose et al. 2016, Rose, Lamers et al. 2016). Le degré d'évolution de ces séquences du VIH-1 était similaire à celui retrouvé avant l'initiation du traitement (virus sauvage) (Lemey, Rambaut et al. 2006, Josefsson, von Stockenstrom et al. 2013), suggérant un rôle important pour ces tissus en tant que sanctuaires viraux. Une autre étude récente, réalisée sur des sujets traités par c-ART, a révélé des preuves de la réplication du virus de type « sauvage » dans les ganglions lymphatiques et d'un ensemencement continu du VIH-1 à partir des sites « sanctuaires ganglionnaires » vers le sang périphérique (Lorenzo-Redondo, Fryer et al. 2016).

Le SNC représente un autre réservoir/sanctuaire potentiel pour le VIH-1. Les cellules cérébrales résidentes, notamment les astrocytes, les macrophages péri-vasculaires et les cellules microgliales ont une longue durée de vie et sont capables d'induire une latence virale (Marban, Forouzanfar et al. 2016). La BHE peut protéger, dans une certaine mesure, le cerveau des infiltrations virales car les patients infectés par le VIH-1 ne présentent pas tous du virus détectable dans les tissus cérébraux et / ou le LCR.

Les populations virales du système nerveux central sont établies au début de l'infection et peuvent rester compartimentées vis-à-vis du virus plasmatique pendant toute la durée de l'infection et même entre différents compartiments cérébraux (Lamers, Salemi et al. 2008, Lamers, Gray et al. 2011), et ce, même lorsque le traitement est initié au cours des premiers

mois de l'infection (Oliveira, Chaillon et al. 2017). Une étude récente a montré que, lors d'interruption du traitement, le virus qui est à l'origine de rebond dans le LCR était distinct de celui détecté dans le plasma, suggérant des sources indépendantes de virus compétents pour la réplication entre le SNC et la périphérie (Gianella, Kosakovsky Pond et al. 2016).

Des pressions thérapeutiques différentes dans les deux compartiments du sang et du SNC pourraient expliquer l'émergence de profils de résistance différents. En effet, une suppression incomplète du virus dans le SNC, provoquée par des facteurs tels que l'absence de diffusion des traitement dans le SNC, peut favoriser les mutations virales et la résistance aux médicaments antirétroviraux, permettant au virus de se redistribuer dans des tissus autres que ceux du SNC. Dans ce contexte, le système nerveux central est considéré comme un réservoir ou un sanctuaire pour le VIH-1 (Abbott 1987).

Le tissu adipeux est lui aussi qualifié de réservoir/sanctuaire potentiel du VIH-1. En effet, le groupe de Bourgeois a révélé que l'ADN du VIH-1 était présent dans le tissu adipeux de tous les sujets étudiés qui suivaient un traitement avec une charge virale indétectable. Cette même étude a montré que la concentration de virus dans la fraction CD4⁺ du tissu adipeux était supérieure à celle des PBMC en périphérie (Damouche, Lazure et al. 2015).

La muqueuse gastro-intestinale joue un rôle majeur dans la transmission rectale du VIH-1 en tant que porte d'entrée et de propagation du virus. Il en va probablement de même pour la transmission mère-enfant du VIH-1 par la muqueuse intestinale de l'enfant pendant l'allaitement. Le tractus gastro-intestinal comprend une grande fraction du nombre total de lymphocytes dans le corps par le biais du GALT qui héberge également de nombreuses cellules immunitaires innées telles que les macrophages et les DC (Iwasaki 2007), ce qui en fait un site favorable à la fois pour la transmission et la réplication du VIH-1. Qualifié de site majeur de réplication du VIH-1, des études ont mis en évidence la persistance du VIH-1 dans le GALT, même après 10 ans de traitement (Chun, Nickle et al. 2008). L'un des mécanismes sous-jacent à la persistance du VIH-1 dans le tractus gastro-intestinal et le GALT peut être l'activation provoquée par la stimulation antigénique des cellules T et B quiescentes, entraînant leur prolifération et une accélération de leur processus de renouvellement, fournissant ainsi au VIH-1 une source continue de cellules à infecter (Cavarelli and Scarlatti

2014). Les macrophages et les CD folliculaires du tractus gastro-intestinal peuvent également contribuer au maintien du réservoir dans ce compartiment (Brown and Mattapallil 2014).

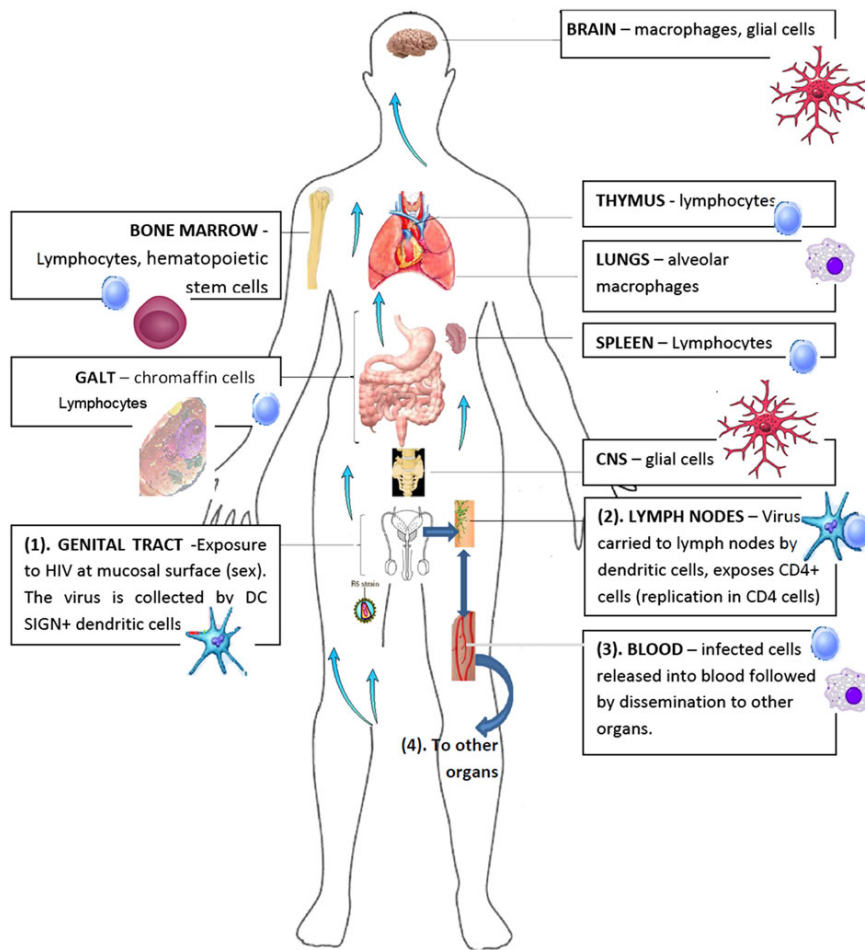


Figure 20. Les sanctuaires anatomiques du VIH-1 (Mzingwane and Tiemessen 2017). Après la transmission muqueuse (1), le virus atteint les ganglions lymphatiques locaux (2) par des cellules dendritiques. Les cellules dendritiques transmettent le virus aux lymphocytes T CD4⁺ permettant au virus de se répliquer et infecter d'autres lymphocytes. Les lymphocytes T CD4⁺ infectés sont libérés dans la circulation sanguine (3) et disséminés vers des réservoirs anatomiques situés dans d'autres organes (4), notamment le cerveau, le système nerveux central, la rate, la moelle osseuse, le thymus, les poumons, les reins, les ganglions lymphatiques et le GALT, établissant ainsi les réservoirs cellulaires dans ces organes.

Par ailleurs, d'autres réservoirs anatomiques ont été décrits, notamment au niveau des voies respiratoires (Twigg, Soliman et al. 1999, Jambo, Banda et al. 2014), du foie (Blackard, Ma et al. 2011), de la rate, de la moelle osseuse et des reins (Winston, Bruggeman et al. 2001). Ces derniers représentent des sanctuaires anatomiques du réservoir VIH-1 et un obstacle à l'éradication du VIH-1.

III. 6. Les différentes méthodes de quantification du réservoir

La thérapie c-ART ne peut pas guérir l'infection par le VIH-1 en raison de la persistance d'un petit nombre de cellules infectées de manière latente hébergeant des provirus compétents pour la réplication. Mesurer le VIH-1 persistant est difficile, car ce dernier consiste en une population en mosaïque de provirus défectueux ou intacts pouvant passer d'un état de latence à une transcription active du VIH-1. En raison de cette complexité, la plupart des tests actuels détectent plusieurs catégories de VIH-1 persistant mais pouvant être défectueux, conduisant souvent à une surestimation de la taille réelle du réservoir latent. Plusieurs études ont montré que ces provirus inactifs latents pouvaient être amenés à se répliquer en culture tissulaire (Finzi, Hermankova et al. 1997, Siliciano, Kajdas et al. 2003) et qu'ils constituaient quand-même une population complexe de provirus à la fois compétents et défectueux (Eriksson, Graf et al. 2013, Ho, Shan et al. 2013, Cohn, Silva et al. 2015, Bruner, Murray et al. 2016, Imamichi, Dewar et al. 2016, Lorenzi, Cohen et al. 2016, Hiener, Horsburgh et al. 2017, Hosmane, Kwon et al. 2017). Ces provirus persistants archivent la diversité génotypique virale apparue au cours de l'infection non traitée et représentent la principale barrière pour la guérison à l'infection par le VIH-1.

Le terme «VIH-1 persistant» est un terme qui englobe toutes les formes d'ADN proviral intégré qui persistent chez les individus infectés plusieurs années après le début du traitement. Ce terme ne définit pas la capacité de réplication des provirus car plusieurs études transversales ont révélé l'existence de variétés d'ADN proviral persistant pouvant être intact ou défectueux (Ho, Shan et al. 2013, Imamichi, Dewar et al. 2016, Hiener, Horsburgh et al. 2017, Lee, Orlova-Fink et al. 2017). En effet, les provirus persistants peuvent exister sous trois formes distinctes. Une fraction des ces provirus persistants peut subir une transcription active et produire des transcrits d'ARN dirigés par LTR dont la nature et les implications cliniques font l'objet de recherches actives (Hermankova, Siliciano et al. 2003, Bullen, Laird et al. 2014, Cillo, Sobolewski et al. 2014, Pasternak, DeMaster et al. 2016, Kaiser, Joshi et al. 2017, Pollack, Jones et al. 2017, Wiegand, Spindler et al. 2017). Une seconde fraction de provirus peut exister dans un état fonctionnellement mort, dans lequel l'initiation de la transcription dirigée par LTR n'est pas possible, en raison de défauts génomiques majeurs (extinction épigénétique irréversible). Enfin, les provirus persistants peuvent exister à l'état latent défini comme un état réversible d'infection non productive (Figure 21). Les provirus

latents sont ceux qui pourraient théoriquement être amenés à exprimer des transcrits dirigés par LTR, pouvant être confrontés à certaines contraintes transcriptionnelles ou épigénétiques (par exemple, absence de facteurs de transcription clés et de co-régulateurs ou des modifications suppressives de la chromatine) qui pourraient empêcher l'initiation ou le maintien de l'expression des gènes.

Compte tenu de la complexité de la persistance du VIH-1 et des nombreuses formes d'ADN proviral persistant, des études ont montré que seuls les provirus compétents pour la réplication virale et capables de provoquer un rebond viral après l'arrêt du traitement c-ART constituent un obstacle au traitement de l'infection par le VIH-1 (Finzi, Hermankova et al. 1997, Finzi, Blankson et al. 1999). Ces provirus persistants et capables de se répliquer constituent le réservoir latent du VIH-1.

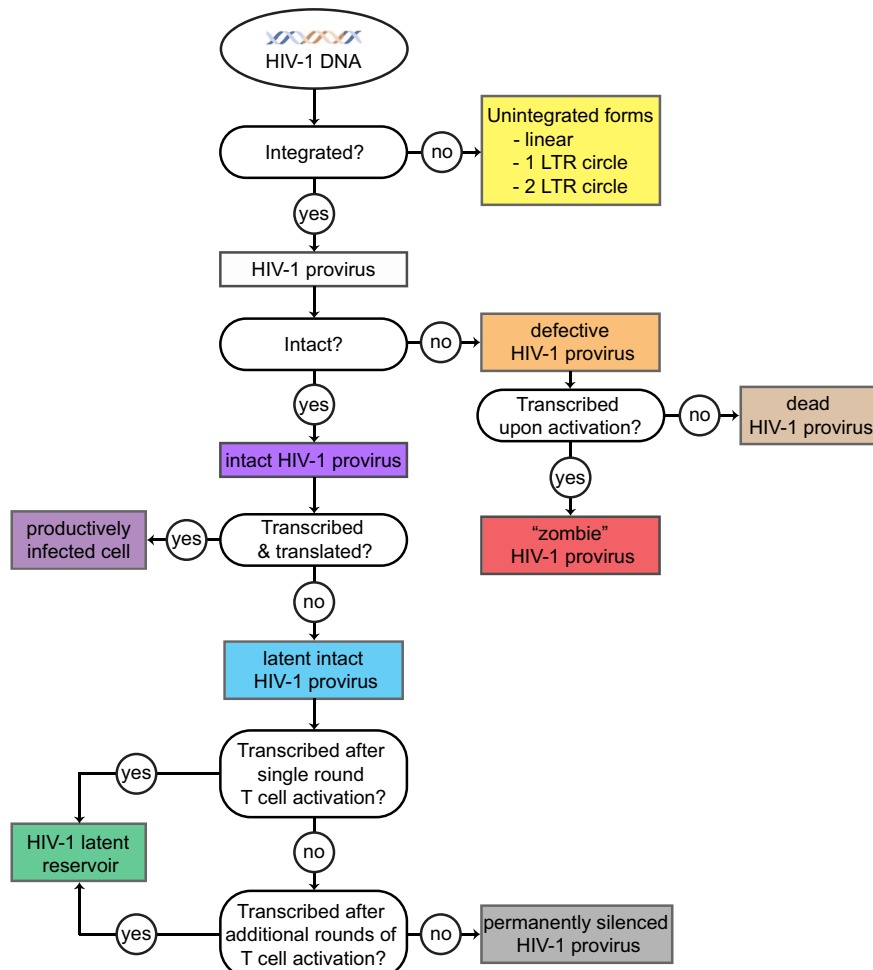


Figure 21. Représentation schématique décrivant la classification de l'ADN du VIH-1 retrouvé chez les individus infectés sous traitement c-ART suppressif (Wang, Simonetti et al. 2018).

La quantification de l'ADN VIH-1, majoritairement sous forme intégrée (Koelsch, Liu et al. 2008), ne permet pas de distinguer les virus compétents pour la réplication virale du virus défectueux. La technique la plus utilisée est la PCR (Polymérase Chain Reaction) Alu qui correspond à l'appariement d'une paire d'amorces à la fois avec une séquence d'un gène viral (Gag, Pol) et d'une séquence Alu conservée et répétée dans le génome cellulaire. Une amplification en PCR nichée (Nested PCR) utilisant des amorces de la région LTR du VIH-1 (Lewin, Murray et al. 2008) apporte une plus grande sensibilité à cette technique. Les formes non intégrées 2 LTR sont caractérisées par leur présence en faible taille et leur courte durée de vie, rendant leur quantification difficile. Ces formes non intégrées, témoins de réplication virale, sont considérées comme des marqueurs d'infection récente dont la réelle labilité au sein de la cellule reste discutée (Sharkey, Babic et al. 2011).

La quantification de l'ADN VIH-1 total, comprenant l'intégré et le non intégré, le virus défectueux et le virus latent, par PCR en temps réel (amorces de la région LTR du génome viral) dans les PBMC est une méthode simple et reproductible pouvant être réalisée à partir de divers tissus ou cellules (Koelsch, Liu et al. 2008). En général, les résultats sont exprimés en copies/million de cellules (PBMC ou de T CD4) et traduisent une fréquence d'infection cellulaire. De très fortes corrélations ont été trouvées entre l'ADN VIH-1 total et intégré chez les patients sous traitements, indiquant que l'ADN VIH-1 total est un marqueur du réservoir viral (Koelsch, Liu et al. 2008). La quantification de l'ADN VIH-1 permet également de représenter le niveau d'infection quand les résultats sont exprimés en copies par millilitre de sang total. Le réservoir peut donc être exprimé en miroir de l'ARN VIH-1 (par ml de plasma sanguin) et des taux de lymphocytes T CD4⁺ (par mm³ de sang total). Ces trois marqueurs sont alors exprimés de la même façon, par rapport à un même volume de sang/plasma, et reflètent une valeur prédictive du risque d'évolution de l'infection (Avettand-Fenoel, Boufassa et al. 2008).

L'ARN VIH-1 plasmatique présent à de faibles niveaux reflète quant à lui une réplication résiduelle mais les résultats de sa quantification restent très corrélés à ceux obtenus par quantification de l'ADN VIH-1 total (Sarmati, Parisi et al. 2012). La quantification de l'ARN VIH-1 plasmatique est réalisée par PCR ultrasensible permettant de détecter jusqu'à une copie/ml de plasma (Haim-Boukobza, Morand-Joubert et al. 2011). Cette technique nécessite un grand volume de plasma et nombre élevé de PCR. A l'échelle cellulaire, la

mesure de l'ARN du VIH-1 associé aux cellules comprend la quantification de l'ARN extracellulaire et des ARN épissés et non épissés intracellulaires. Si la cellule est en phase latente, sa production virale est bloquée et l'ARN VIH-1 extracellulaire fortement diminué. En revanche, la production d'ARN épissés et non épissés peut persister dans le cytoplasme (Figure 22) (Pasternak, Jurriaans et al. 2009).

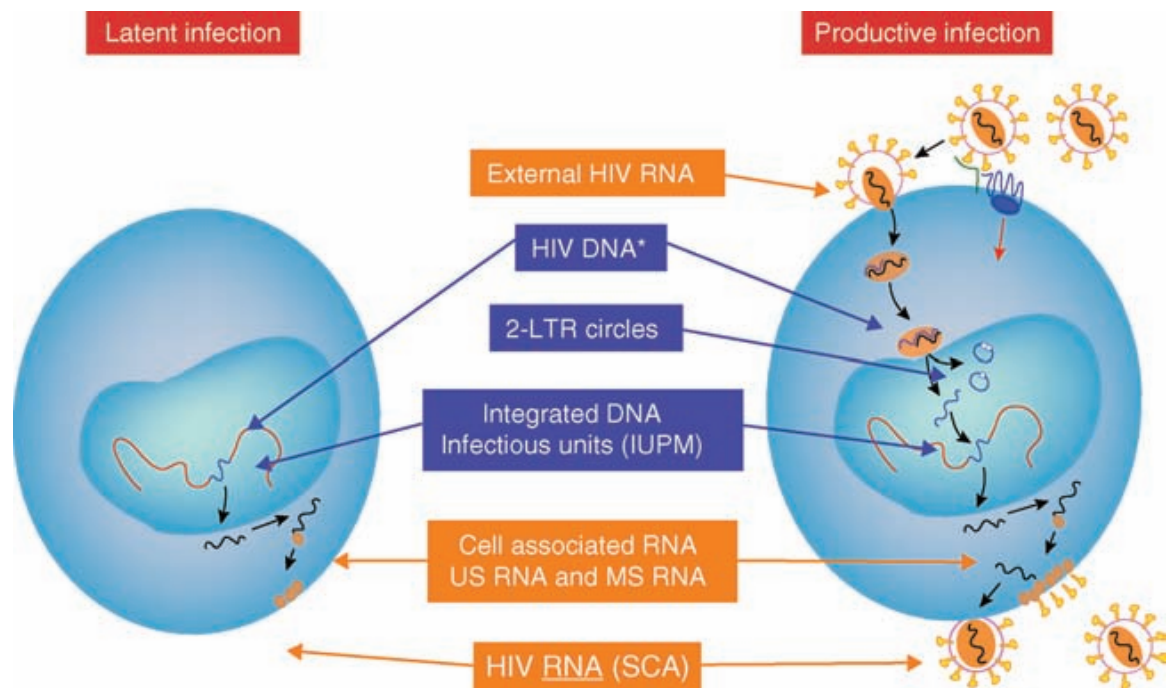


Figure 22. Représentation des différentes formes virales dans les cellules infectées latentes (à gauche) et productives (à droite) et les tests de quantification principaux des différentes formes l'ADN VIH-1 (en bleu) et d'ARN VIH-1 (en orange) (Lewin and Rouzioux 2011).

Le groupe de Siliciano a apporté en 1995 la première preuve expérimentale directe de la persistance d'un ADN proviral complet capable de se répliquer (Chun, Finzi et al. 1995). Cette étude a démontré que l'ADN proviral intégré latent pouvait être facilement détecté dans les lymphocytes T CD4⁺ provenant de donneurs virémiques, et que ces provirus quiescents pouvaient être induits par activation pour produire un virus infectieux (Chun, Finzi et al. 1995). Peu de temps après, d'autres études ont démontré que le VIH-1 compétent pour la répllication pouvait être récupéré chez des individus infectés sous traitement c-ART suppressif (Chun, Carruth et al. 1997, Chun, Stuyver et al. 1997, Finzi, Hermankova et al. 1997). De plus, des études longitudinales ont montré que malgré l'efficacité du traitement c-ART, le réservoir latent se détériorait très lentement (demi-vie de 44 mois) (Finzi, Blankson

et al. 1999, Siliciano, Kajdas et al. 2003, Crooks, Bateson et al. 2015). Cette stabilité remarquable fait du réservoir latent la principale barrière au traitement de l'infection par le VIH-1.

La méthode QVOA (The Quantitative Viral Outgrowth Assay) représente le test de référence pour quantifier la fréquence des lymphocytes T CD4⁺ quiescents ayant intégré le VIH-1 latent (Figure 23) (Finzi, Hermankova et al. 1997). Cette technique se base sur la mise en co-culture de cellules T CD4⁺ quiescentes hautement purifiées à partir du sang de donneurs VIH⁺ sous traitement c-ART avec les cellules d'un donneur séronégatif et la mesure du nombre d'unités infectieuses produites par million de cellules (*Infectious Units Per Million cells*, IUPM) (Chun, Carruth et al. 1997, Finzi, Blankson et al. 1999). Étant donné que ces cellules quiescentes ne produisent pas de virus sans activation des cellules T (Chun, Finzi et al. 1995), toute production de virus induite dans cette population reflète la présence de VIH-1 latent. Pour inverser la latence et induire la production de virus, ces cellules sont stimulées avec un activateur de lymphocytes T (PHA mitogène ou des PBMC allogéniques irradiées) (Patel, Duby et al. 1988, Finzi, Hermankova et al. 1997, Siliciano and Siliciano 2005, Laird, Rosenbloom et al. 2016). Le virus libéré se propage par addition de cellules sensibles à l'infection, ce qui permet une hausse exponentielle du virus produit à partir d'une seule cellule infectée de manière latente.

	Viral outgrowth assay (QVOA, MSVOA)	Full-length single genome sequencing	Integration site sequencing	Alu PCR	qPCR/ddPCR	Cell-associated RNA assays
Unintegrated forms		Yellow			Yellow	?
Dead HIV-1 provirus		Brown	Brown	Brown	Brown	
"Zombie" HIV-1 provirus		Red	Red	Red	Red	Red
Defective HIV-1 provirus		Orange	Orange	Orange	Orange	Orange diagonal lines
Permanently silenced HIV-1 provirus		Grey	Grey	Grey	Grey	
Intact HIV-1 provirus		Blue	Blue	Blue	Blue	Blue diagonal lines
HIV-1 latent reservoir	Green diagonal lines	Green	Green	Green	Green	Green diagonal lines

Figure 23. Tableau récapitulatif des tests courants de détection des différentes formes d'ADN du VIH-1 persistant (Wang, Simonetti et al. 2018).

La limite majeure de l'utilisation de cette technique est la nécessité d'un volume important de sang tel qu'apporté par des cytophères. De plus, elle présente un large coefficient de variation et ne peut pas être réalisée avec des biopsies tissulaires (Lewin and Rouzioux 2011, Ho, Shan et al. 2013).

Au départ, la QVOA a été réalisée sur des cellules T CD4⁺ mémoires quiescentes définies par l'absence de marqueurs d'activation cellulaire à leur surface (CD69, CD25, HLA-DR). Cependant, comme le réservoir latent dans les cellules T CD4⁺ quiescentes a été décrit comme mécanisme de persistance du VIH-1, la QVOA est aujourd'hui réalisée sur des pools de cellules T CD4⁺ comprenant les cellules T quiescentes et activées provenant de donneurs séropositifs. De plus, d'autres conditions d'activation des cellules T CD4⁺ ont été utilisées avec succès telles que l'utilisation d'anticorps anti -CD3 et -CD28 (Wong, Hezareh et al. 1997, Kuzmichev, Veenhuis et al. 2017), et de PMA (phorbol 12-myristate 13-acétate) associée à la Ionomycine (Bullen, Laird et al. 2014).

Après la réactivation des provirus latents via la stimulation des cellules T, le virus libéré se propage par addition de cellules sensibles à l'infection par le VIH-1 telles que les PBMC pauvres en cellules CD8⁺ (Beliakova-Bethell, Hezareh et al. 2017) et certaines lignées cellulaires telles que les cellules MOLT-4 / CCR5 et les cellules Sup-T1 (Laird, Eisele et al. 2013, Fun, Mok et al. 2017). La production virale est ensuite détectée par ELISA (au jour 14) de l'antigène p24 et la fréquence de l'infection latente est calculée sur la base des dilutions des puits de cellules et de la production virale détectée (Rosenbloom, Elliott et al. 2015). La détection par RT-qPCR de l'ARN du VIH-1 dans le surnageant de culture au jour 7 a permis de raccourcir significativement la QVOA. De plus, deux études récentes ont démontré que des lymphocytes T CD4⁺ provenant de donneurs infectés par le VIH-1 sous c-ART soumis à plusieurs cycles d'activation permettrait l'augmentation de la production virale (Ho, Shan et al. 2013, Hosmane, Kwon et al. 2017).

Il est intéressant de noter que des provirus similaires ont pu être obtenus à partir de puits de culture distincts après différents nombres de cycles d'activation des cellules T, ce qui suggère que les lymphocytes T CD4⁺ de cette expansion clonale peuvent ne pas répondre de manière uniforme à un cycle donné d'activation des lymphocytes T (Lorenzi, Cohen et al. 2016, Simonetti, Sobolewski et al. 2016). La QVOA standard (un cycle d'activation) peut donc être

considérée comme une estimation minimale de la taille du réservoir latent ne capturant qu'une fraction du réservoir latent. La QVOA à stimulation multiple capture une fraction sans cesse croissante du réservoir latent avec chaque cycle successif d'activation et de prolifération des cellules T. Le réservoir latent est donc défini comme des provirus génétiquement intacts et donc capables de se répliquer *in vivo* (Wang, Simonetti et al. 2018).

Plusieurs méthodes ont été développées pour distinguer les provirus défectueux des provirus intacts capables de se répliquer. Des études récentes basées sur le séquençage du virus complet ont permis d'examiner la nature des défauts présents dans la réplication de provirus incompetents retrouvés dans les puits de QVOA qui étaient négatifs pour la production virale et ont détecté de grandes délétions internes et / ou une hypermutation médiée par APOBEC3G (Ho, Shan et al. 2013, Bruner, Murray et al. 2016). Par ailleurs, une étude récente a démontré que les provirus présentant des hypermutations et des défauts dans le site majeur d'épissage pouvaient être transcrits, que les ARN obtenus pouvaient être épissés et traduits, et que les cellules portant ces provirus défectueux pouvaient être reconnues et ciblées par les lymphocytes T cytotoxiques (CTL) spécifiques du VIH-1 (Pollack, Jones et al. 2017).

Le séquençage du provirus complet présente de nombreux avantages par rapport aux autres méthodes qui explorent uniquement les régions sous-génomiques. En effet, ces dernières peuvent induire un biais aboutissant à des données de séquences non représentatives de la population réelle de provirus du VIH-1 lié à l'hétérogénéité engendrée par la présence de délétions internes et d'hypermutations (Wang, Simonetti et al. 2018).

Le groupe de Nussenzweig a récemment développé une nouvelle stratégie permettant d'enrichir et de purifier les cellules T CD4⁺ latentes réactivées provenant d'individus infectés par le VIH-1 sous traitement c-ART. Dans cette méthode, les cellules T CD4⁺ sont activées avec de la PHA pendant 36h en présence de cinq antirétroviraux puissants et d'un inhibiteur de la caspase. Les cellules exprimant la protéine d'enveloppe de VIH-1 (Env) ont été marquées avec un cocktail d'anticorps neutralisants anti-Env biotinylés, puis enrichies à l'aide de billes magnétiques suivi du tri de cellules exprimant à la fois Env et Gag (combinaison d'expression de Env et de l'ARNm de gag du VIH-1). Les cellules latentes réactivées ont produit des virus complets et intacts dont les séquences Env exprimées étaient identiques à celles détectées dans les virus qui ont émergé dans les cultures de QVOA, et représentent

donc des clones de cellules T expansées in vivo (déterminé par leur séquence de récepteur TCR). L'analyse de l'expression des gènes a révélé que ces cellules partagent un profil de transcription qui inclut l'expression de gènes impliqués dans la désactivation du virus permet une division cellulaire sans activation des voies de mort cellulaire normalement déclenchées par la réplication du VIH-1 (Cohn, da Silva et al. 2018).

Deux études ont réalisé un séquençage NGS (Next Generation Sequencing) du provirus VIH-1 complet en utilisant la technologie d'Illumina MiSeq (Hiener, Horsburgh et al. 2017, Lee, Orlova-Fink et al. 2017), permettant de trier les séquences sur la base de la présence d'anomalies qui empêcheraient la réplication. L'étude du groupe de Lichterfeld a par ailleurs révélé des proportions plus élevées de provirus intacts dans les lymphocytes T CD4⁺ Th1 (Lee, Orlova-Fink et al. 2017). Cette nouvelle approche est rentable et fournit suffisamment de données de séquençage pour étudier la composition des provirus dans des sous-populations cellulaires d'intérêt.

Récemment, le groupe de Palmer a utilisé la technique FLIP (Full-Length Individual Sequencing) pour étudier les variations de l'ADN proviral dans les lymphocytes T CD4⁺ à différents stades de différenciation (Hiener, Horsburgh et al. 2017) et a permis d'identifier des clones expansés chez tous les sujets de l'étude (n = 6), tant pour les provirus défectueux que pour les provirus intacts. Des provirus génétiquement identiques indiquent une prolifération cellulaire, car le taux d'erreurs de la transcriptase inverse du VIH-1 limite la transcription de provirus identiques par réplication de novo (Maldarelli, Wu et al. 2014, Wagner, McLaughlin et al. 2014, Cohn, Silva et al. 2015, Lee, Orlova-Fink et al. 2017). Les résultats de cette étude ont donc confirmé le rôle de la prolifération cellulaire dans la persistance du VIH-1. De plus, les proportions des provirus intacts étaient différentes selon les sous-ensembles, classées respectivement de la plus faible à la plus élevée $T_{CM} < T_N < T_{TM} < T_{EM}$ (Hiener, Horsburgh et al. 2017).

Conclusion

Les conséquences de l'infection par le VIH-1 sont donc la destruction accrue des lymphocytes T CD4⁺, le dysfonctionnement de l'homéostasie lymphocytaire associé à l'activation immunitaire et l'établissement du réservoir viral. Ce réservoir, cellulaire et tissulaire, est constitué de cellules cibles infectées par le VIH-1 de manière latente, qui parviennent à échapper au système immunitaire. Le niveau d'activation et de prolifération de ces cellules, l'absence de marqueurs membranaires du réservoir, l'incapacité des antirétroviraux à les atteindre et leur durée de vie relativement longue, permettent le maintien de la persistance virale.

IV. Problématique et objectifs du travail de thèse

Bien que les thérapies antirétrovirales c-ART soient très efficaces pour réduire la morbidité et la mortalité liée au VIH-1 et épargner des millions de vies, ce traitement ne parvient pas à l'éradication complète du virus de l'organisme. En effet, le traitement inhibe considérablement la réplication du VIH-1 et permet de réduire la charge virale plasmatique à des niveaux indétectables, mais dès lors que le traitement est interrompu, un rebond viral rapide est observé chez de nombreux individus. Ce rebond de charge virale est la preuve incontestable de la persistance du virus et de la mise en place d'un réservoir pour le VIH-1 malgré les traitements.

La réplication du VIH-1 dépend de l'état d'activation et de division de la cellule (McDougal, Cort et al. 1985, Douek, Brenchley et al. 2002). Les cellules T CD4⁺ mémoires ont été décrites comme la principale cible du VIH-1 (Schnittman, Lane et al. 1990) et sont massivement déplétées au cours d'une infection aiguë (Mattapallil, Douek et al. 2005). Les mécanismes de cette déplétion chez les individus infectés par le VIH-1 reste un sujet important d'investigation.

La mise en évidence du rôle de la molécule SAMHD1 dans l'infection par le VIH-1 en tant que facteur de restriction a ouvert de nouvelles perspectives dans la compréhension de la pathogénicité du virus. En effet, il a été clairement démontré que dans les cellules myéloïdes comme les monocytes/macrophages et les DC (Hrecka, Hao et al. 2011, Laguette, Sobhian et al. 2011) ainsi que les lymphocytes T CD4⁺ quiescents (Baldauf, Pan et al. 2012, Descours, Cribier et al. 2012), SAMHD1, une dNTP triphosphohydrolase, jouait un rôle important dans la protection de ces cellules de l'infection par le VIH-1. SAMHD1 limite l'infection par le VIH-1 par diminution du pool intracellulaire de dNTP conduisant au blocage de la transcription inverse (Baldauf, Pan et al. 2012, Descours, Cribier et al. 2012) et la phosphorylation de SAMHD1 s'est révélée cruciale dans la restriction de l'infection par le VIH-1 (Cribier, Descours et al. 2013, Welbourn, Dutta et al. 2013, White, Brandariz-Nunez et al. 2013). En revanche, le rôle de cette molécule dans l'infection des lymphocytes CD4⁺ mémoires qui sont souvent la cible préférentielle du virus pour se répliquer, n'a pas été élucidé.

Le rôle de SAMHD1 dans les différentes sous-populations de cellules T CD4⁺ provenant d'individus non infectés et infectés par le VIH-1 n'a pas été étudié de manière détaillée. Deux

études récentes ont montré que les lymphocytes T mémoire CD4⁺ dotés de propriétés similaires à celles des cellules souches et exprimant faiblement SAMHD1 sont favorables à l'infection par le VIH-1 (Buzon, Sun et al. 2014, Tabler, Lucera et al. 2014). Cependant, il reste à déterminer si l'expression et la fonction de SAMHD1 sont comparables dans d'autres sous-ensembles de lymphocytes T CD4⁺, tels que les cellules effectrices, les cellules centrale mémoires et transitionnelle mémoires, car ces cellules sont plus vulnérables à la réplication du VIH-1 (McDougal, Cort et al. 1985, Douek, Brenchley et al. 2002). Des études ont révélé un lien entre la persistance de cellules infectées de manière latente et l'intégration provirale dans des gènes liés à la prolifération cellulaire (Maldarelli, Wu et al. 2014, Wagner, McLaughlin et al. 2014).

Dans une étude ultérieure publiée en 2015 (Ruffin, Brezar et al. 2015), nous avons réalisé des analyses phénotypiques et fonctionnelles des lymphocytes T CD4⁺ du sang périphérique et des ganglions lymphatiques de sujets infectés par le VIH-1 traités ou non traités, et de sujets non-infectés. Dans cette étude, nous avons révélé l'existence d'une sous-population de lymphocytes T CD4⁺ mémoires exprimant de faibles niveaux de SAMHD1 (CD4⁺ CD45RO⁺ SAMHD1^{low}), alors que la grande majorité des cellules CD3⁺ circulantes (94 ± 0,7%), expriment cette molécule à des niveaux plus élevés (Ruffin, Brezar et al. 2015). Ces cellules SAMHD1^{low} étaient présentes préférentiellement dans le compartiment mémoire des PBMC de sujets adultes et n'ont pas été retrouvées dans le sang de cordon.

Nous avons montré que la population CD4⁺ CD45RO⁺ SAMHD1^{low} présente un phénotype très différencié (CCR7^{+/-}, CD27^{+/-}) exprimant des molécules d'activation (CD38⁺, HLA-DR⁺), et présente une grande proportion de cellules cycliques Ki67⁺ et est significativement diminuée chez les patients infectés par le VIH-1 par rapport aux sujets sains. De plus, nous avons montré que les cellules qui prolifèrent in vitro voient leur expression de SAMHD1 diminuer, et que cette diminution de l'expression de SAMHD1 était associée à une plus grande susceptibilité de ces cellules à l'infection par le VIH-1, confirmant ainsi le rôle de SAMHD1 comme facteur de restriction.

Dans cette même étude ultérieure, nous avons également montré que dans le sang périphérique, ces cellules sont enrichies en cellules Th17 alors que dans les ganglions elles ont un phénotype de Tfh, des sous-populations cellulaires décrites comme étant des sites

principaux de réplication du virus. Nous avons constaté que les cellules Tfh présentes dans les organes lymphoïdes secondaires exprimaient faiblement SAMHD1, et présentaient une plus grande susceptibilité à l'infection par le VIH-1 in vitro. Cependant, la proportion de cellules SAMHD1^{low} dans les ganglions lymphatiques n'a pas diminué chez les patients infectés par rapport aux sujets non-infectés, confirmant leur rôle de réservoir dans les ganglions. Globalement, nos résultats démontrent que les cellules T CD4⁺ connues pour être susceptibles à l'infection par le VIH-1, à savoir les cellules Th17 et Tfh, expriment faiblement de facteur de restriction SAMHD1 révélant un rôle de modulation de l'expression de SAMHD1 dans l'infection par le VIH-1 et la déplétion des lymphocytes T CD4⁺.

L'ensemble de ces résultats révélant l'existence de cellules T CD4⁺ mémoires SAMHD1^{low} dans le sang périphérique (enrichies en Th17) et les ganglions lymphatiques (Tfh) d'individus infectés et non infectés par le VIH-1, et prenant en compte la sensibilité de ces cellules à l'infection, nous avons émis l'hypothèse que les cellules SAMHD1^{low} représentent une cible préférentielle pour le VIH-1 et pourrait jouer un rôle dans l'établissement et la persistance du réservoir du VIH-1, ouvrant ainsi des perspectives pour explorer les voies conduisant à la persistance virale dans les cellules.

Les données exposées ci-avant ont été le point de départ de mon projet de thèse qui est la « Caractérisation d'une nouvelle population de lymphocytes T CD4⁺ mémoires exprimant faiblement le facteur de restriction SAMHD1 ».

Dans mon projet, nous avons examiné (i) le phénotype des cellules mémoires SAMHD1^{low} à forte capacité de prolifération, (ii) si ces cellules contenaient des niveaux élevés d'ADN du VIH-1 avec des populations distinctes de VIH-1, (iii) l'existence d'une compartimentation virale, et (iv) les caractéristiques fonctionnelles de ces cellules en performant un séquençage à haut débit.

Les objectifs de mon projet sont :

- Caractérisation phénotypique des cellules mémoires SAMHD1^{low}. La caractérisation phénotypique des cellules mémoires SAMHD1^{low} par cytométrie en flux permet de déterminer le caractère d'activation, d'épuisement et de sénescence.

- Une analyse quantitative de l'ADN VIH-1. La quantification de l'ADN viral dans les sous-populations cellulaires mémoires SAMHD1⁺ et SAMHD1^{low}, et naïves SAMHD1⁺ détermine la quantité de cellules cibles infectées (réservoir cellulaire) et permet de démontrer si les cellules mémoires SAMHD1^{low}, hautement prolifératives, contiennent plus d'ADN du VIH-1 et contribuent à la persistance du virus.
- Une analyse qualitative de l'ADN VIH-1. Le séquençage à haut débit du gène de l'enveloppe du VIH-1 isolé à partir de sous-populations cellulaires mémoires SAMHD1⁺ et SAMHD1^{low}, et naïves SAMHD1⁺ permet la réalisation d'arbres phylogénétiques et la comparaison des séquences génétiques afin de déterminer l'existence ou non d'une compartimentation et/ou migration de populations VIH-1 entre nos cellules d'intérêt SAMHD1^{low} et les cellules SAMHD1⁺.
- Une Analyse des profils transcriptionnels par NGS. Caractériser d'avantage les cellules SAMHD1^{low} permet la mise en évidence de marqueurs membranaires qui aideront à leur isolation pour des études fonctionnelles.

Ce travail permettra d'élucider d'une part les mécanismes qui conduisent à la déplétion des lymphocytes mémoires CD4⁺ au cours de l'infection par le VIH-1 et d'autre part d'explorer les voies conduisant à la persistance du virus dans les cellules.

MATERIELS ET METHODES

I. Caractérisation phénotypique par cytométrie en flux

a. Caractérisation phénotypique des populations cellulaires dans le sang périphérique

Les individus HIV⁺ inclus dans cette étude font partie de la cohorte de patients physiopathologique de l'hôpital Henri Mondor - Créteil. Comme contrôles HIV⁻, des échantillons de donneurs sains de l'Etablissement Français du Sang ont été utilisés.

Nous avons utilisé des prélèvements de sang total frais (prélevés le jour même) à partir duquel les cellules mononuclées du sang périphérique (PBMCs, Peripheral Blood Mononuclear Cells) ont été isolés, de n=17 patients infectés par le VIH-1 de manière chronique recevant un traitement antirétroviral avec une médiane de LT CD4⁺ =522 cellule/ml et une charge virale HIV-1 ARN < 20 copies/ml (Tableau 1, Annexe 1). Comme contrôle HIV⁻, nous avons utilisé des prélèvements de sang total frais de n=13 individus récoltés par l'Etablissements Français du Sang (E.F.S). Les prélèvements étaient sous forme de tubes de sang EDTA de 6ml, à raison de 6 à 7 tubes en moyenne par donneur (~42ml de sang total/patient). Après isolation des PBMCs par gradient de séparation Ficoll, une partie des cellules a été directement utilisée pour la caractérisation phénotypique (2.10⁶ cellules) et le reste des cellules a été cryoconservé dans du milieu de congélation composé de SVF supplémenté de Diméthylsulfoxyde (DMSO 10%).

Les cellules PBMC des différents patients ont été réparties sur une plaque de marquage 96 puits à fond conique, puis lavées avec du PBS 1X 2% SVF. Pour le marquage extracellulaire, les culots cellulaires ont été re-suspendus dans 20ul de mix d'anticorps: l'APC-Vio770 anti-CD4, PerCP-Cy5.5 anti-CD3 (fourni par Milteniy Biotech, Paris, France), AF700 anti-CD4, Pacific.Blue anti-CD3, APC-H7 anti-CD8, PE-CF594 anti-CD45RO, PE anti-CD57, PE-Cy7 anti-PD-1, APC anti-CD95, Alexa-Fluor 647 anti-CCR4, PE anti-CXCR3, PE-Cy7 anti-CCR6 (fournit par Becton Dickinson Biosciences, Pont de Claix, France), PE anti-2B4 (fourni par Beckman Coulter). Le mix d'anticorps a été réalisé dans du PBS 1X 2% SVF. Un marqueur de viabilité cellulaire « Live/Dead » a été ajouté au mix d'anticorps afin d'exclure les cellules mortes (Live/Dead Vivid detection kit, couplé avec aqua dye, Invitrogen). Les cellules ont été incubées pendant 30 minutes à 4°C, à l'abri de la lumière, avant de subir un nouveau lavage (PBS 1X 2% SVF).

A la suite du marquage extracellulaire, les cellules ont été fixées/perméabilisées (protocole détaillé dans la partie « quantification du réservoir ») puis marquées dans 20ul de mix d'anticorps : Alexa-Fluor 488 anti-SAMHD1 (fournit par l'équipe du Dr Olivier Schwartz, Institut Pasteur), PerCP Cy5.5 anti-Ki67, PE anti-Ki67 (fournit par Becton Dickinson Biosciences), Rabbit Poly-Ab anti-SAMHD1 (fourni par Protein Tech Europe) + Alexa-Fluor 647 anti-Rabbit (fourni par LifeTech).

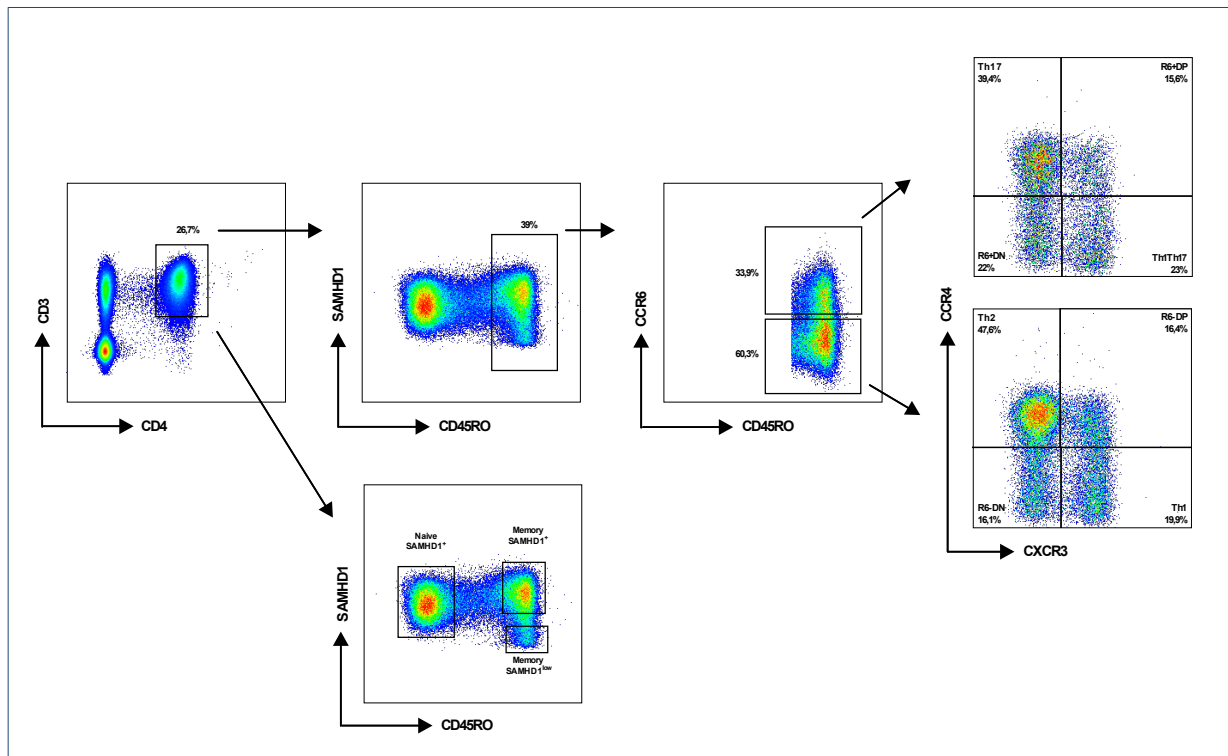


Figure 1. Stratégie de gating des lymphocytes T CD4⁺ en sous-population mémoires CD45RO⁺: Th17 (CCR6⁺ CCR4⁺ CXCR3⁻), Th1Th17 (CCR6⁺ CCR4⁻ CXCR3⁺), CCR6⁺ DN (CCR4⁻ CXCR3⁻), CCR6⁺ DP (CCR4⁺ CCR3⁺), mémoire CD45RO⁺ SAMHD1⁺, mémoire CD45RO⁺ SAMHD1^{low} et naïves CD45RO⁻ SAMHD1⁺.

Après 30 minutes d'incubation à 4°C dans l'obscurité, les cellules ont été lavées puis re-suspendues dans du PBS 1X 2% SVF avant d'être analysées au Cytomètre de Flux LSR II (FACS Becton Dickinson LSR II). Tous les réglages et compensations ont été fait à l'aide de billes directement couplées avec chacun des fluorochromes utilisés dans le panel. Les résultats obtenus par le cytomètre ont été analysés avec la version 10.0.7 du logiciel FlowJo (Tree Star Inc., Ashland, Oregon, USA) (Figure 1).

b. Caractérisation phénotypique des populations cellulaires dans le tractus digestif

Nous avons utilisé des prélèvements de sang total frais (5 tubes EDTA de 6ml, ~30ml de sang total/patient) et des biopsies rectales (prélevées le jour même, ~total de 11 biopsies) de patients infectés par le VIH-1 (n=6), provenant du Centre Hospitalier Régional d'Orléans (Dr Hocqueloux, Tableau 2, Annexe 1). En contrôles HIV⁻, des PBMCs de donneurs sains de l'Etablissement Français du Sang et des biopsies excisionnelles de colons de sujets VIH-1-ont été utilisés. Les cellules PBMCs ont été fraîchement isolées du sang total par gradient de séparation Ficoll. Les lymphocytes de la lamina propria ont été isolés des biopsies rectales et excisionnelles de colons suivant un protocole qui a été développé au laboratoire.

b.1. Isolation des lymphocytes de la lamina propria

Matériel

- Préparer du milieu IEL (Intraepithelial Lymphocytes) composé de 200ml de milieu RPMI, 300ul de MgCl₂ (Magnesium Chloride, 1M final), 2ml de SVF (1% final) et 0.07g d'EGTA (1mM final).
- Préparation du milieu LPL (Lamina Propria Lymphocytes) composé de 30ml de milieu RPMI, 2ml de SVF et 0.006g de Collagenase II (100 U.ml⁻¹ final).
- Préparer du milieu de lavage composé de PBS 1X 5% SVF.

Méthode

- Les biopsies sont transportées dans du milieu à 4°C.
- Récupérer délicatement les biopsies dans un tube 50ml.
- Ajouter 20ml de milieu de lavage dans le tube de milieu de transport filtré puis conserver à 4°C.
- Ajouter 30ml de milieu IEL au tube de biopsies puis incubé 30min à 37°C sous agitation à 300rpm.
- Vortexer 1 min puis filtrer les biopsies et récupérer le milieu IEL.
- Ajouter au milieu filtré 20ml de milieu de lavage (=IEL-1) puis conserver à 4°C.
- Ajouter 30ml de nouveau milieu IEL aux biopsies.
- Incuber 30min à 37°C sous agitation à 300rpm.

- Vortexer 1 min puis filtrer les biopsies et récupérer le milieu IEL.
- Conserver le milieu filtré + 20ml de milieu de lavage à 4°C (=IEL-2).
- Ajouter 30ml de milieu LPL aux biopsies.
- Incuber 30min à 37°C sous agitation à 250rpm.
- A l'aide d'une seringue 30ml Ø2mm aspirer et éjecter énergiquement (broyage mécanique) les biopsies rectales : 8 à 12 fois.
- Incuber 30min à 37°C sous agitation à 250rpm.
- Refaire l'opération de broyage mécanique des biopsies rectales a l'aide d'une seringue 30ml Ø2mm: 8 à 12 fois.
- Filtrer le milieu LPL à l'aide d'un filtre Ø70nm puis ajouter 20ml de milieu de lavage et conserver à 4°C (=LPL).
- Centrifuger les milieux IEL-1, IEL-2, LPL et le milieu de transport 4min à 1800rpm.
- Resuspendre le culot cellulaire dans 2ml de milieu de lavage puis compter les cellules.
- Transférer les cellules dans un tube FACS 5ml et procéder au marquage.

b.2. Marquage cellulaire et analyse

Le protocole de marquage extracellulaire et intracellulaire ainsi que les étapes de l'analyse FACS utilisés sont les mêmes que celles décrites dans le partie « Caractérisation phénotypique dans le sang total ». Le panel d'anticorps utilisé était le suivant : anti -CD4 (couplé avec APC-Vio770, Miltenyi Biotec), -CD3 (couplé avec Pacific Blue, BD Bioscience) et -CD45RO (couplé avec PE-CF594, BD Bioscience) pour le marquage intracellulaire. Les cellules ont ensuite été marquées en intracellulaire avec un anticorps anti-SAMHD1 (Alexa-Fluor 488, fournit par l'équipe du Dr Olivier Schwartz, Institut Pasteur) après fixation et perméabilisation.

II- Quantification du réservoir et Séquençage à haut débit

a. Cohorte de patients

Les individus HIV⁺ inclus dans cette étude font partie de la cohorte de patients physiopathologique de l'hôpital Henri Mondor - Créteil.

Nous avons utilisé des prélèvements de sang total frais de n=42 patients infectés par le VIH-1

de manière chronique. Parmi ce groupe de patients, n=36 reçoivent un traitement antirétroviral (c-ART, durée médiane de traitement= 7ans) avec une médiane du nombre de LT CD4⁺=549 cellule/ μ l et un nadir CD4⁺= 210 cellules/ μ l (Tableau 3, Annexe 1), et n=6 patients Elite Controllers (EC) infectés par le VIH-1 depuis plus de dix ans sans jamais avoir reçu de traitement antirétroviral, avec une médiane de LT CD4⁺= 900 cellules/ μ l (Tableau 4, Annexe 1).

b. Quantification du réservoir

b.1. Isolation des LT CD4⁺

Nous avons utilisé des prélèvements frais de sang de patients infectés par le VIH-1 (prélevés le jour même), sous forme de tubes de sang EDTA de 6ml, à raison de 7 tubes en moyenne par donneur (~42ml de sang total/patient). Les PBMCs ont été fraîchement isolées du sang total par gradient de séparation Ficoll. Pour chaque patient, des échantillons contrôles de PBMC « fixées » et « non fixées » ont été prévus (0.5×10^6 de PBMC pour chacune des deux conditions).

Un enrichissement en lymphocytes T CD3⁺ CD4⁺ a d'abord été réalisé grâce à des billes magnétiques par sélection négative (CD4⁺ T Cell Isolation Kit II, Miltenyi Biotec). Il s'agit d'un cocktail d'anticorps couplés à de la biotine (Biotin-Antibody Cocktail) et dirigés contre un grand nombre d'antigènes hormis CD3⁺ et CD4⁺, ajouté aux PBMCs re-suspendus dans du MACS Buffer (Miltenyi Biotec), puis incubé 10min à 4°C. Un second anticorps anti-biotin couplé à des billes magnétiques (Anti-Biotin Microbeads) a été ajouté puis incubé à 4°C pendant 15 min. Après un lavage au MACS Buffer et élimination du surnageant, les cellules ont été re-suspendues dans du MACS Buffer. Une colonne LS (Miltenyi Biotec) conservée à 4°C a été placée sur un aimant et rincées avec 1 ml de MACS Buffer, sur laquelle la suspension cellulaire a été par la suite rajoutée. L'élution des cellules T CD3⁺ CD4⁺, non retenues sur la colonne, se fait par ajout de trois fois 1 ml de MACS Buffer.

b.2. Marquage et tri cellulaire

Les lymphocytes T CD3⁺ CD4⁺ isolés ont été lavés dans du PBS 1X complémenté de 2% de SVF (sérum de veau foetal) dans des tubes FACS de 5ml avant d'être marqués en surface. Les culot cellulaires ont été re-suspendus avec un mix d'anticorps couplés à des fluorochromes

contenant de l'anti -CD4 (couplé avec APC-Vio770, Miltenyi Biotech), -CD3 (couplé avec Pacific Blue, BD Bioscience) et -CD45RO (couplé avec PE-CF594, BD Bioscience). Le mix d'anticorps a été réalisé dans du PBS 1X 2% SVF. Les cellules ont été incubées pendant 30 minutes à 4°C, à l'abri de la lumière, avant de subir un nouveau lavage (PBS 1X 2% SVF).

A la suite du marquage extracellulaire, les cellules sont passées par une étape de fixation/perméabilisation en vue d'un marquage intracellulaire. Les lymphocytes T CD3⁺ CD4⁺ ont été incubés 30 minutes à 4°C dans un tampon de marquage FoxP3 (Foxp3/Transcription Factor Staining Buffer Set, Affymetrix eBioscience) en suivant le protocole du Kit. Après incubation, les cellules ont été lavées deux fois avant d'être re-suspendues dans du tampon de lavage (Wash Buffer, Affymetrix eBioscience) contenant l'anticorps anti-SAMHD1 (Alexa-Fluor 488, fournit par l'équipe du Dr Olivier Schwartz, Institut Pasteur). Après 30 minutes d'incubation à 4°C dans l'obscurité, les cellules ont été lavées puis re-suspendues dans du PBS 1X 2% SVF.

Tout de suite après le marquage intracellulaire, les cellules ont été transportées dans du PBS 1X 2% SVF à 4°C jusqu'à l'Institut Pasteur avant d'être immédiatement triées en utilisant un trieur MoFlo Astrios (Soc Beckman). Les cellules triées ont été récupérées dans des tubes FACS contenant 2ml de PBS 1X 50% SVF.

Les cellules ont été triées selon l'expression de CD45RO et SAMHD-1 (Figure 2), en trois populations :

- 1- Naïves CD45RO⁻ SAMHD1⁺
- 2- Mémoires CD45RO⁺ SAMHD1⁺
- 3- Mémoires CD45RO⁺ SAMHD1^{low}

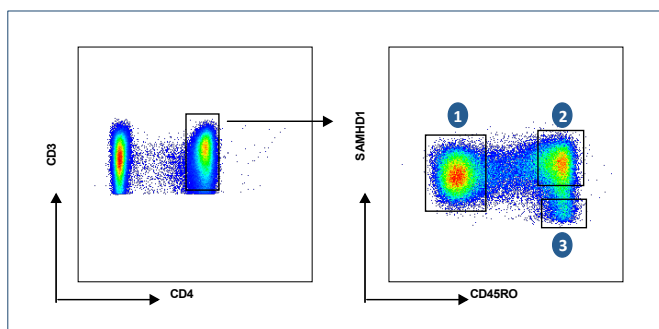


Figure 2. Stratégie de gating utilisée pour le tri des trois populations de lymphocytes T CD4⁺. 1- Naïves CD45RO⁻ SAMHD1⁺, 2- Mémoires CD45RO⁺ SAMHD1⁺, 3- Mémoires CD45RO⁺ SAMHD1^{low}.

Après le tri des cellules de chaque patient (Tableau 1), la pureté était systématiquement vérifiée pour chaque population et les valeurs de pureté étaient comprises entre 93% et 99%. La population de cellules mémoires CD45RO⁺ SAMHD1^{low} étant beaucoup moins abondante que les deux autres (population d'intérêt), nous avons décidé de préserver la totalité des cellules triées pour l'extraction.

N pt	CD45RO ⁻ SAMHD1 ⁺	CD45RO ⁻ SAMHD1 ⁺	CD45RO ⁻ SAMHD1 ^{low}	PBMCs fixées	PBMCs non-fixées
1	1,87M	421,3 K	58K	500K	500K
3	670,992 K	346,493 K	19,952 K	300K	300K
7	959 K	817 K	58 K	300K	300K
8	2,1M	956K	98K	500K	500K
9	1,67 M	1,1 M	76,23 K	500K	500K
10	1,1 M	313,355 K	41,486 K	500K	500K
11	311 K	911 K	46 K	300K	300K
12	3,4 M	2 M	113 K	500K	500K
13	1,6 M	863K	61K	300K	300K
14	4,52 M	1,43 M	97,85 K	500K	500K
15	1 M	787 K	71 K	300K	300K
17	105 K	315 K	45 K	300K	300K
18	510 K	1,03 M	40 K	300K	300K
19	2,43 M	1,83 M	95,36 K	500K	500K
31	2,89M	1,68M	95K	500K	500K
32	2 M	653 K	50,93 K	300K	300K
33	2,71 M	3,89 M	81,4 K	500K	500K
34	8,533 K	11,014 K	2,780 K	300K	300K
35	6 M	1,8 M	86 K	500K	500K
36	1,40 M	1,08 M	180 K	300K	300K

Tableau 1. Nombre de cellules triées dans les trois sous-populations cellulaires par donneur. Sont représentés les nombres de cellules triées dans chacune des trois sous population (valeurs comptabilisées par le trieur) et des PBMCs contrôle par donneur (n=20 donneurs pour lesquels les valeurs sont disponibles). Le nombre de cellules triées varie selon les donneurs et selon les populations cellulaires : 1- Naïves CD45RO⁻ SAMHD1⁺ entre 8.5K et 6M, 2- Mémoires CD45RO⁺ SAMHD1⁺ entre 11K et 3.9M et 3- Mémoires CD45RO⁺ SAMHD1^{low} entre 2.7K et 180K.

b.3. Extraction de l'ADN VIH-1 dans les cellules triées

Immédiatement après le tri, les cellules ont été lavées dans du PBS 1X 0.5% SVF puis une étape de « decross-link » a été réalisée avant l'extraction: dépôt de 20 µl de Protéinase K et 200 µl de Tampon AL, incubé 10 min à 56°C puis ajouter 1.25 mM NaCl. Après 4h

d'incubation à 66°C, ajouter 40ul de protéinase K incubé 60min à 45°C. Les échantillons étaient conservés à -80°C en attendant l'extraction.

L'extraction de l'ADN viral était réalisée sur colonne Qiagen avec le Kit QiaAmp DNA Blood mini kit suivant le protocole du fournisseur, adapté pour l'étape de lyse cellulaire: dépôt de 40ul de protéinase K et vortexer 15 secondes, incubé à 56°C pendant 30 minutes et homogénéiser toutes les 10 minutes, puis incubé à 100°C pendant 30 minutes et homogénéiser toutes les 10 minutes, puis en suivant le protocole d'extraction du kit.

b.4. Calcul et ajustement de la quantité de cellules par échantillon

Le nombre de cellules était défini par PCR quantitative en temps réel du gène de l'albumine. La quantité est mesurée grâce à une gamme de quantification préparée à partir d'ADN génomique humain (1µg= 150.000 cellules). L'amplification du gène cellulaire Albumine, présent à 2 copies/cellule, permet de quantifier précisément le nombre de cellules/ml d'échantillon. Les résultats étaient exprimés en nombre de copies cible d'intérêt par ml d'échantillon.

La PCR quantitative TAQMAN (TaqManABI PRIS M 7500, Applied Biosystems-Courtaboeuf France), a été réalisée par utilisation des kit qPCR Mastermix No Rox et qPCR Mastermix Plus Low Rox (Rt-QP2X-03+NR et RT-QP2X-03+WOU LR Eurogentec-Belgique, respectivement). Le mélange réactionnel et le programme du thermocycleur sont décrits ci dessous (Tableau 2).

Réactif	Volume utilisé (µl)	Concentration finale	Température	Temps	
Master Mix No ROX Eurogentec	6,25	0,5X	50°C	2 min	
Master Mix Low ROX Eurogentec	6,25	0,5X	95°C	10 min	
Sondes Alb 100pmole/µl	0,05	5 pmole	95°C	15 sec	45 cycles
A5 150pmole/µl	0,05	7,5 pmole	60°C	1 min	
A3 150pmole/µl	0,05	7,5 pmole			
Pré-Mix CI Simplexa (sonde CY5)	0.2	-			
H2O qsp 20µl	7,15	-			
ADN	5	-			

Tableau 2. Mélange réactionnel et paramètres du thermocycleur pour la réaction de RT-qPCR. Volume du mix de réaction : 20 µl, volume d'extrait: 5 µl.

Séquences des amorces:

A5 : 5' gct gtc atc tct tgt ggg ctg t 3'

A3 : 5' aaa ctc atg gga gct gct ggt t 3'

La sonde était marquée FAM (6-carboxy fluoresceine) TAMRA (Applied Biosystems-Courtaboeuf France) 5' cct gtc atg ccc aca caa atc tct cc 3'

b.5. Quantification de l'ADN VIH-1 total et 2-LTR dans les cellules triées

La quantification de l'ADN VIH-1 total et 2-LTR a été réalisée par l'équipe du Dr Olivier Delelis à l'ENS-Cachant. Les protocoles qui ont été utilisés sont détaillés dans la référence suivante : (Munir, Thierry et al. 2013).

b.6. Quantification de l'ADN VIH-1 total dans les cellules triées

L'ADN total du VIH-1 était quantifié par PCR en temps réel à l'aide de la trousse Generic HIV DNA Cell (Bioncentric), par détection et amplification de la région LTR de l'ADN VIH-1 cellulaire total. La quantification a été réalisée sur 20ul d'extrait d'acide nucléique avec un maximum de 150 000 cellules, suivant le protocole du fournisseur. La quantification était calibrée par une gamme d'ADN VIH-1 de la souche HXB2 (produite par la lignée cellulaire 8^{E5}, 1 copies d'ADN par VIH-1 par cellule) dont les concentrations étaient préalablement définies grâce à une gamme de standard dilué de 10 en 10 (6 à 6000 copies/20ul de solution). La quantité de copies d'ADN VIH-1 était exprimée par million de cellules.

c. Séquençage à haut débit 4.5.4 de l'ADN VIH-1

c.1. Préparation des amplicons

A partir des ADN extraits, la région C2V3 du gène de la glycoprotéine d'enveloppe gp120 était amplifiée par deux PCR successives et indépendantes (PCR1 et Nested PCR), réalisée sur thermocycleur Eppendorf.

L'ADN extrait des cellules triées était amplifié par utilisation du kit Taq Platinum High Fidelity (Invitrogen), à partir de 20ul d'extrait. Le mix réactionnel et le programme du thermocycleur de la PCR1 sont décrits ci dessous (Tableau 3).

Réactif	Volume utilisé (µl)	Concentration finale	Température	Temps	
dNTP	2	0,4 mmol/l	94°C	2 min	40 cycles
MgSO4	2	2 mmol/l	94°C	30 sec	
Taq Platiniium Pol	0,25	0,05 UI/µl	50°C	30 sec	
Tampon de réaction	5	1X	68°C	1 min	
Amorce sens	1	0,2 µmol/l	68°C	5 min	
Amorce anti-sens	1	0,2 µmol/l	4°C	infini	
H2O	18,75	-			
ADN	20	-			

Tableau 3. Mélange réactionnel et paramètres du thermocycleur pour la réaction de PCR1. Volume du mix de réaction : 30 µl, volume d'extrait: 20 µl.

Les amorces utilisées pour la PCR1 étaient:

5'-CAGTACAATGTACACATGG-3' (amorce sens env-8)

5'-ATGGGAGGGGCATAC-3' (amorce anti-sens env-31)

Les produits de la PCR1 étaient utilisés purs pour amplification par Nested PCR (PCR nichée). Le mix réactionnel et le programme du thermocycleur de la PCR2 sont décrits ci dessous (Tableau 4).

Réactif	Volume utilisé (µl)	Concentration finale	Température	Temps	
dNTP	1	0,2 mmol/l	94°C	3 min	40 cycles
MgSO4	2	2 mmol/l	94°C	30 sec	
Taq Platiniium Pol	0,25	0,05 UI/µl	50°C	30 sec	
Tampon de réaction	5	1X	68°C	45 sec	
Amorce sens	1	0,2 µmol/l	68°C	5 min	
Amorce anti-sens	1	0,2 µmol/l	4°C	infini	
H2O	34,75	-			
ADN	5	-			

Tableau 4. Mélange réactionnel et paramètres du thermocycleur pour la réaction de Nested PCR. Volume de mix de réaction : 45 µl, volume de produit de PCR1: 5 µl.

Les amorces utilisées pour cette Nested PCR étaient des amorces de la boucle C2V3 de la gp120 intégrant : un adaptateur A pour l'amorce sens et B pour l'amorce anti-sens, une clé de reconnaissance du 4.5.4 et un code d'identification des amplicons lors des analyses de « MID 1 » à « MID 8 » (Figure 3, Tableau 5).

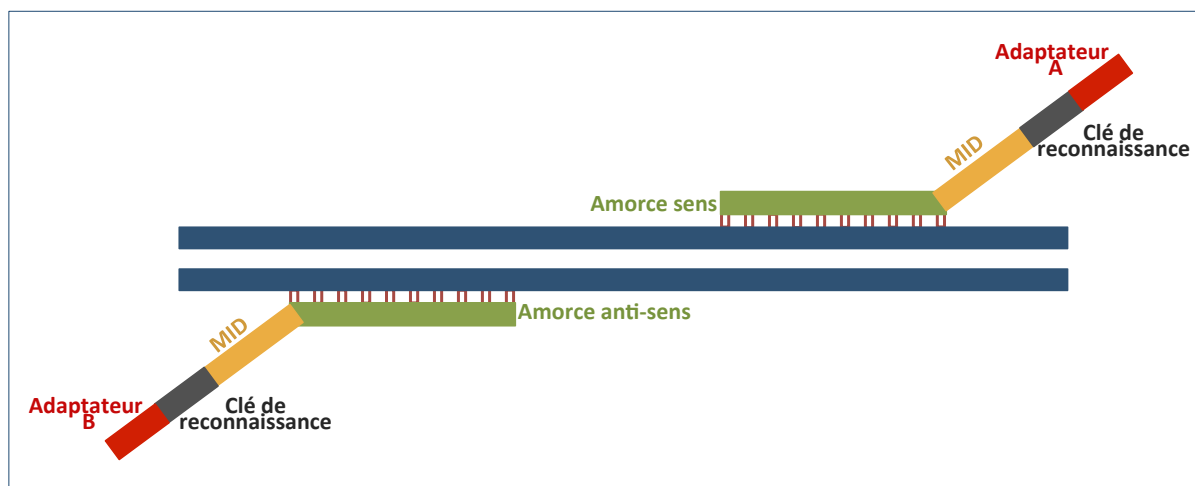


Figure 3. Structure des amorces de Nested PCR. Les amorces sens et anti-sens sont attachées, dans l'ordre, à un code-barre « MID » pour taguer les amplicons, une clé de reconnaissance reconnue par le séquenceur 4.5.4, et un adaptateur A ou B pour assurer la fixation ultérieure sur les billes de pyroséquençage.

Les séquences des amorces utilisées pour la PCR2:

5'-AATGGCAGTCTAGCAGAAG-3' (amorce sens env-7)

5'-ATGGGAGGGGCATACATTG-3' (amorce anti-sens ed-33)

NOM	ADAPTATEUR	CLE	MID	AMORCE
PATIENT 1	CGTATCGCCTCCCTCGGCCA	TCAG	ACGAGTGCGT	AATGGCAGTCTAGCAGAAG
PATIENT 1	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGC	TCAG	ACGAGTGCGT	TTACAGTAGAAAAATTCCCCTCC
PATIENT 2	CGTATCGCCTCCCTCGGCCA	TCAG	ACGCTCGACA	AATGGCAGTCTAGCAGAAG
PATIENT 2	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGC	TCAG	ACGCTCGACA	TTACAGTAGAAAAATTCCCCTCC
PATIENT 3	CGTATCGCCTCCCTCGGCCA	TCAG	AGACGCACTC	AATGGCAGTCTAGCAGAAG
PATIENT 3	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGC	TCAG	AGACGCACTC	TTACAGTAGAAAAATTCCCCTCC
PATIENT 4	CGTATCGCCTCCCTCGGCCA	TCAG	AGCACTGTAG	AATGGCAGTCTAGCAGAAG
PATIENT 4	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGC	TCAG	AGCACTGTAG	TTACAGTAGAAAAATTCCCCTCC
PATIENT 5	CGTATCGCCTCCCTCGGCCA	TCAG	ATCAGACACG	AATGGCAGTCTAGCAGAAG
PATIENT 5	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGC	TCAG	ATCAGACACG	TTACAGTAGAAAAATTCCCCTCC
PATIENT 6	CGTATCGCCTCCCTCGGCCA	TCAG	ATATCGCGAG	AATGGCAGTCTAGCAGAAG
PATIENT 6	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGC	TCAG	ATATCGCGAG	TTACAGTAGAAAAATTCCCCTCC
PATIENT 7	CGTATCGCCTCCCTCGGCCA	TCAG	CGTGTCTCTA	AATGGCAGTCTAGCAGAAG
PATIENT 7	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGC	TCAG	CGTGTCTCTA	TTACAGTAGAAAAATTCCCCTCC
PATIENT 8	CGTATCGCCTCCCTCGGCCA	TCAG	CTCGCGTGTG	AATGGCAGTCTAGCAGAAG
PATIENT 8	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGC	TCAG	CTCGCGTGTG	TTACAGTAGAAAAATTCCCCTCC

Tableau 5. Séquences sens et anti-sens des adaptateurs, clés, MID et amorces utilisés pour la Nested PCR

L'amplification était contrôlée par vérification de la taille des amplicons en utilisant la Tape Station 2200 (Agilent) et le kit D1000 ou D5000, selon les recommandations du fournisseur (Figure 4).

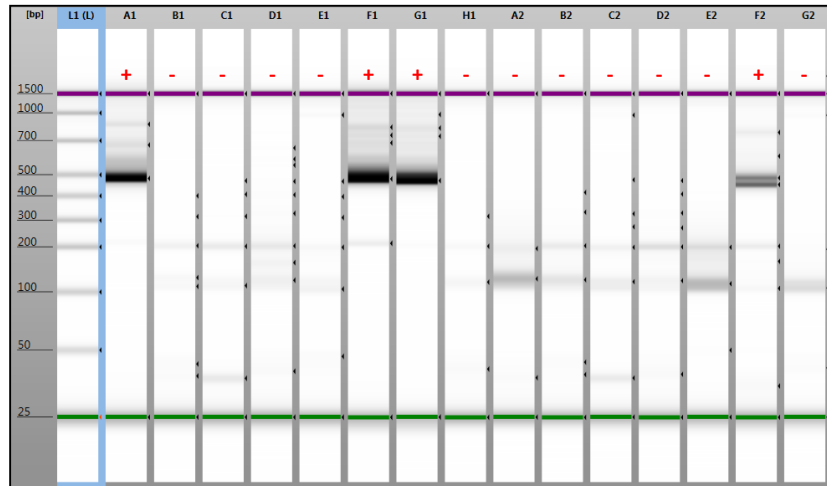


Figure 4. Visualisation des gels de validation de la taille des amplicons.

La taille des amplicons a été vérifiée par migration de gel en utilisant la Tape Station (Agilent) et le kit D1000 ou D5000. La taille attendue est 444pb (région C2V3= 374pb, adaptateur+ clé+ MID= 70pb).

c.2. Séquençage par la technique SANGER

Un premier séquençage était réalisé par la technique classique de Sanger. L'ADN amplifié était purifié par digestion des petits fragments de moins de 50pb par l'enzyme ExoSap de la trousse PCR Cleanup (Abbott®), selon le protocole du fournisseur (15 minutes à 37°C suivi par 15 minutes à 80°C). La réaction de séquence était réalisée en utilisant la trousse BigDye Terminator v.1.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystem) suivant le protocole du fabricant et le programme suivant (Tableau 6) :

Température	Temps	28 cycles
96°C	10 sec	
50°C	5 sec	
60°C	4 min	

Tableau 6. Paramètres du thermocycleur pour la réaction de séquences

Les produits de la réaction de séquence étaient purifiés sur des colonnes Sephadex (GE Healthcare) par exclusion des petits fragments d'ADN puis séquencés sur le séquenceur 3130 XL Genetic Analyzer (applied Biosystems).

L'analyse des séquences était réalisée sur la plateforme en ligne Smartgene. L'alignement des séquences a été réalisé grâce au logiciel Clustal W2, puis des arbres phylogénétiques ont été

réalisés selon la méthode du « Neighbor Joining » grâce au logiciel Mega v7 afin d'éliminer toute contamination entre les séquences des différents échantillons.

c.3. Séquençage à haut débit 4.5.4

Pour cette étude, le séquenceur utilisé était le 4.5.4 GS Junior (Roche) avec technologie de pyroséquençage sur micropuce. La trousse GS Junior emPCR Kit Lib-A (Roche) était utilisée en suivant le protocole du fournisseur. Les étapes du séquençage sont les suivantes (Figure 5):

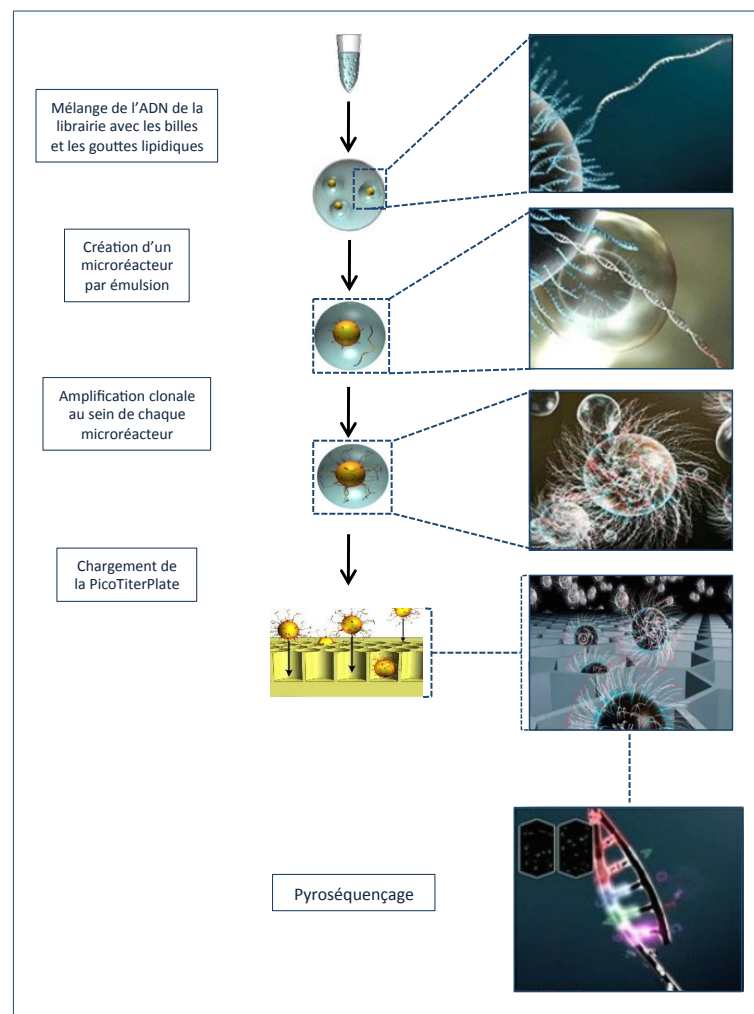


Figure 5. Etapes de la PCR en émulsion en vue du pyroséquençage. Après adjonction des MID sur les brins d'ADN, chaque brin d'ADN vient se fixer à une microbille. Puis une émulsion est réalisée afin de créer un microenvironnement lipidique autour de chacune des microbilles, supplémenté de nucléotides, d'enzymes et de tous les tampons nécessaires à une réaction de PCR. Cette amplification par PCR est réalisée par la suite en émulsion pour former des microbilles hérissées, couvertes de brins d'ADN identiques au brin initialement fixé lors de la réalisation de la librairie. Ces microbilles hérissées vont être déposées dans les puits de la PicoTiterPlate à raison d'une seule microbille par puits, en vue du pyroséquençage.

- Constitution d'une « librairie » à partir des différents amplicons pourvus de code barre « MID » (de MID-1 à MID-8), de la clé de reconnaissance et de l'adaptateur A ou B, préparés préalablement. Cette librairie est constituée d'amplicon de 8 échantillons différents (de MID-1 à MID-8) et la quantité d'ADN y est ajustée de sorte à ce que les 8 échantillons soient présents en proportions égales.
- Réalisation d'une émulsion à partir de microbilles, dont chacune est couplée à un seul et unique brin d'ADN. L'émulsion consiste à créer un microenvironnement lipidique autour de chacune des microbilles, supplémenté de nucléotides, d'enzymes et de tous les tampons nécessaires à une réaction de PCR. Cette amplification clonale par PCR est réalisée par la suite en émulsion pour former des microbilles hérissées, couvertes de brins d'ADN identiques au brin initialement fixé lors de la réalisation de la librairie.

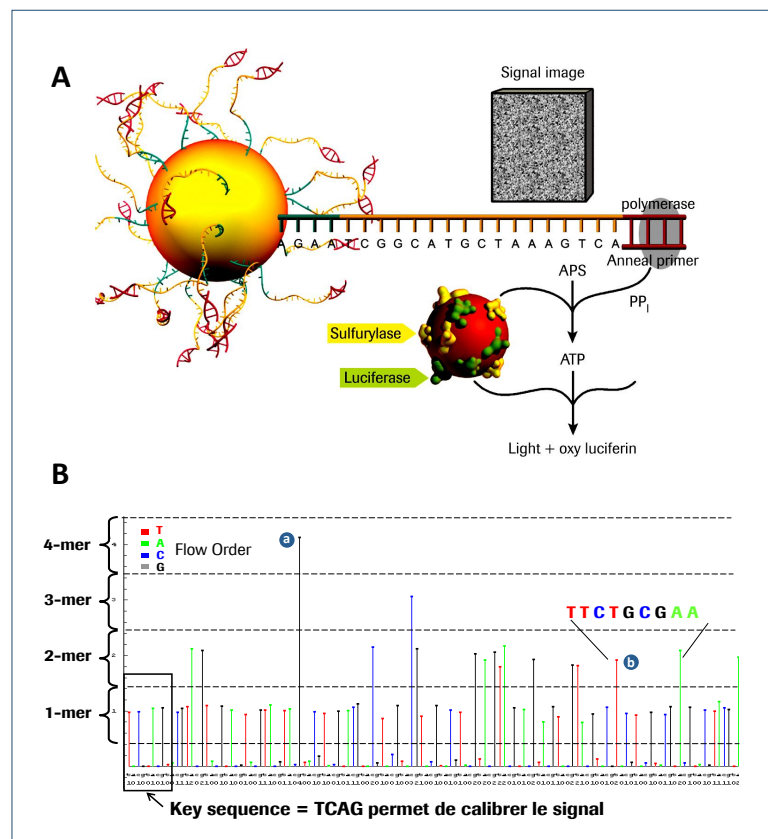


Figure 6. Etapes du pyroséquençage. **A-** Le séquenceur incorpore les différents nucléotides un par un dans tous les puits de la PicoTiterPlate. La caméra du séquenceur détecte en suite la fluorescence émise lors de l'intégration des nucléotides. **B-** Les fluorescences sont représentées en différentes couleurs pour chaque type de nucléotides. La succession d'un même nucléotide à la fois émet un signal fluorescent d'intensité supérieure à celui engendré par un seul nucléotide : a- succession de quatre bases « guanine », b- succession de deux bases « thymine ».

- Un enrichissement et purification en billes hérissées d'ADN sont réalisés par sélection positive grâce à des lavages de billes magnétiques.
- Dépôt des billes de captures hérissées avec les fragments d'ADN sur la plaque de séquençage qui est une micropuce PicoTiterPlate, à raison d'une seule bille par puits.
- Le pyroséquençage est réalisé sur le séquenceur 4.5.4 GS Junior (Roche) en mode « Full Processing Amplicon », séquençage bidirectionnel en 200 cycles (Figure 6).

c.4. Analyses bioinformatiques des séquences et construction des arbres phylogénétiques

La première partie de l'analyse bioinformatique est réalisée en utilisant la plateforme en ligne « Galaxy » (<https://usegalaxy.org>). Grâce à cette plateforme, les séquences nucléotidiques brutes qui sont lues par le séquenceur sont combinées dans un premier temps, puis, un score de qualité de lecture est attribué pour chaque nucléotide identifié par le séquenceur. Les valeurs du score de qualité sont généralement comprises entre 0 et 35-40, 40 étant le niveau de qualité le plus haut pouvant être atteint. Ensuite, chaque séquence lue par le séquenceur est démultiplexée grâce au MID qui lui a été attribué auparavant, de sorte à différencier les individus et rassembler toutes les séquences d'un même individu dans un même fichier, cette étape est appelée « Démultiplexage par MID ». Vient ensuite l'étape de « Nettoyage des séquences ». Cette étape permet d'éliminer les séquences de mauvaise qualité ou de qualité insuffisante par application d'un programme préétabli organisé en deux filtres. Le premier filtre permet, par « Floating Window » (fenêtre flottante), d'analyser la qualité des séquences, nucléotide par nucléotide de 3' à 5', et d'éliminer les séquences dont le score de qualité est inférieur à 30/40 (Figure 7). Le second filtre de qualité combine les scores attribués aux nucléotides de chaque séquence, puis élimine les séquences dont la moyenne de score de qualité des nucléotides est inférieure à 25.

Après ces étapes de nettoyage réalisées sur la plateforme en ligne « Galaxy », les séquences de bonne qualité ou de qualité suffisante sont analysées par le logiciel « Qure » afin de constituer les haplotypes puis reconstituer les variants viraux. Un haplotype est une séquence qui englobe un certain nombre de variants génétiquement très proches les uns des autres. Un haplotype est validé et considéré « réel » lorsque le logiciel « Qure » estime que les différences détectées

entre les séquences des variants viraux ne sont pas aberrantes au point d'être attribuées à une erreur du séquenceur. Les taux d'erreurs tolérées par le logiciel « Qure » étaient de 1% dans les régions homopolymériques et de 0.5% dans les régions hétéropolymériques, et le nombre d'interactions était défini à 3000.

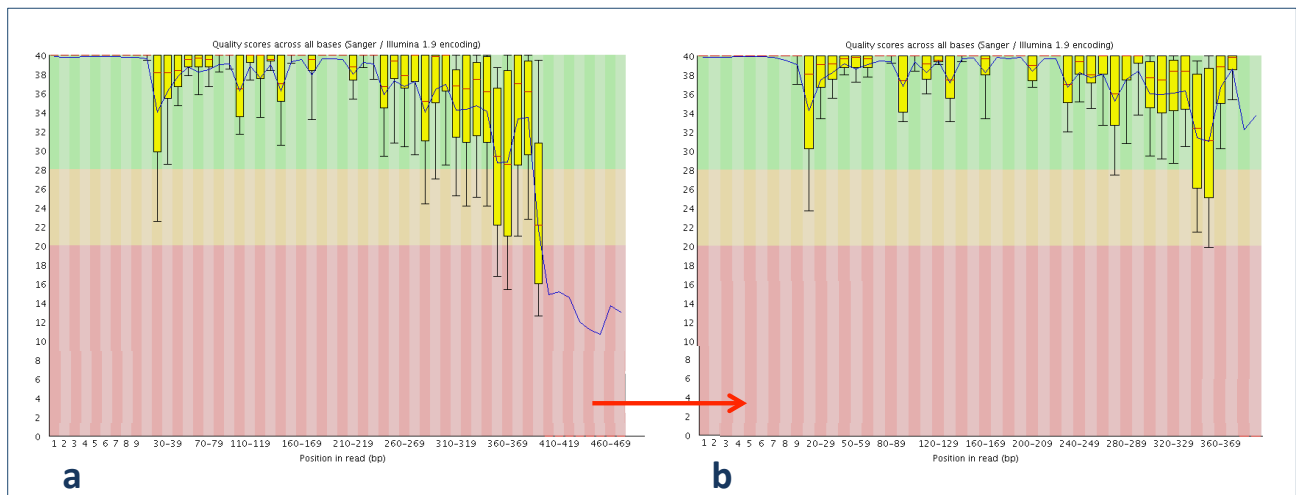


Figure 7. Visualisation graphique des scores de qualité moyens par nucléotide avant (a) et près (b) application des filtres de qualité. En abscisse: position des nucléotides dans la séquence. En ordonnée: score de qualité de 0 à 40 (de 0 à 20, en rouge : séquences éliminées car la qualité est trop basse; de 20 à 30, en orange : qualité moyenne et de 30 à 40, en vert : bonne qualité). Captures d'écran : plateforme Galaxy.

L'alignement des haplotypes obtenus était réalisé sur le logiciel « Clustal W2 » supplémenté d'un contrôle visuel et des corrections manuelles si nécessaire (Figure 8). La séquence de référence utilisée lors de l'alignement des séquences était celle de la souche HXB2 (GenBank : AF033819). L'arbre de chaque patient a été construit par utilisation de la méthode « Neighbor Joining » du logiciel « Mega v7 ». Cette méthode se base sur le modèle Tamura Nei supplémenté de test statistique (FST, Slatkin Maddison) validant la robustesse de chaque branche de l'Arbre.

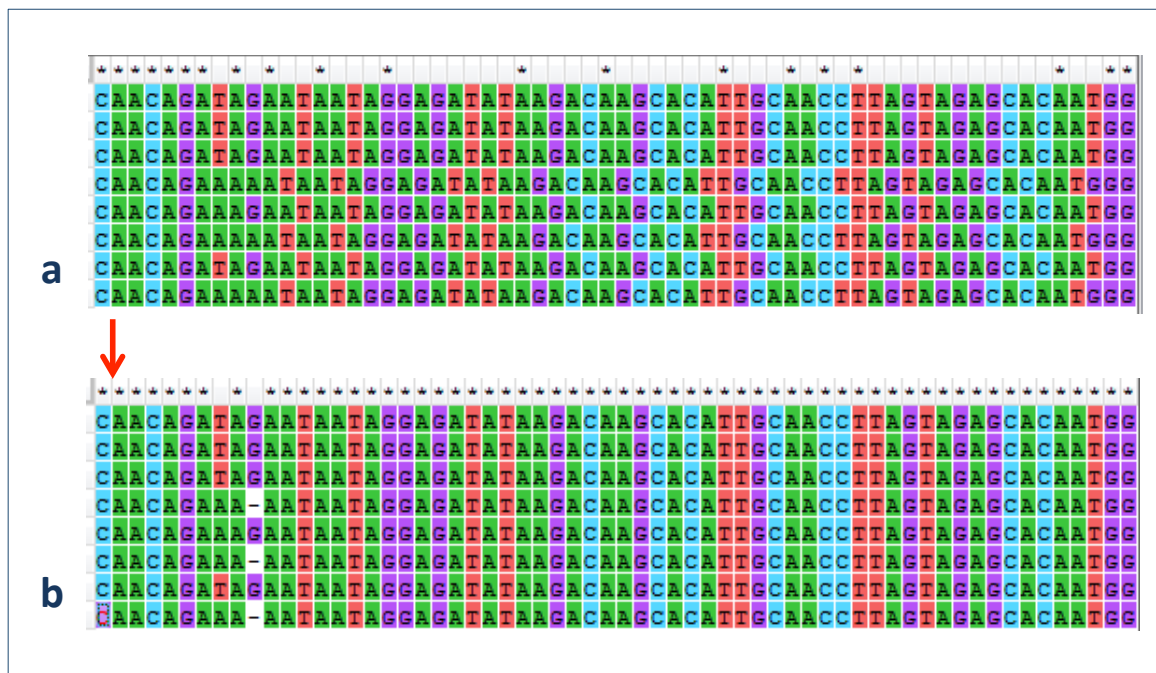


Figure 8. Visualisation d'alignement de séquences issues du pyroséquencage. Exemple d'une partie des séquences alignées les unes par rapport aux autres par comparaison des acides nucléiques séquencés à chaque position dans le gène amplifié. Captures d'écran : logiciel Clustal W.

III- Analyse des profils transcriptionnels

a. Analyse des gènes codants sur puce à ADN

Nous avons utilisé le sang périphérique de sujets sains récolté à l'EFS, sous forme de tubes de sang EDTA (n=3, 6 tubes en moyenne par sujet, ~24ml de sang total/sujet). Les PBMCs du sang périphérique de ces sujets ont été fraîchement isolées du sang total par gradient de séparation Ficoll avant d'être utilisées.

En vue d'une analyse sur puces à ADN, les cellules CD3⁺ CD4⁺ préalablement isolées par billes magnétiques (détaillé dans la partie « Quantification du réservoir »), ont été marquées au CFSE (Carboxyfluorescein diacetate Succinimidyl Ester) 15 min à 37°C, puis activées à l'aide d'anticorps anti-CD3 et anti-CD28 dans du milieu de culture (RPMI 10% SVF), pendant quatre jours à 37°C sur une plaque de 24 puits.

Après incubation, les cellules ont été lavées puis re-suspendues dans du PBS 1X 2% SVF et triées dans le but d'obtenir trois sous-populations basées sur leur degré de division in vitro: Division 1, D1 « low », D2 « medium », D3 « high », grâce à un trieur MoFlo Legacy

(Beckman Coulter, Plateforme IMRB). Les cellules triées ont été récupérées dans du PBS RNase free.

L'extraction d'ARN a été réalisée juste après le tri sur colonnes Qiagen (kit RNeasy Micro, Qiagen) suivant les recommandations du fournisseur, et quantifiés par méthode spectrophotométrique (NanoDrop™ 8000, Fisher Scientific, Illkirch Cedex, France). Leur qualité a été vérifiée par méthode fluorométrique (BioAnalyzer 2100™, Agilent Technologies, Massy Cedex, France). Les ARN complémentaires (ARNc) ont été synthétisés à partir d'ADN complémentaire simple puis double brin, et marqués à la biotine avec le kit Illumina® TotalPrep™ RNA Amplification, (Ambion®, Invitrogen) et ensuite purifiés sur colonnes Qiagen (kit RNeasy Mini). Les ARNc marqués ont été hybridés sur les puces à ADN HT12 V4 d'Illumina®. Toutes les étapes d'expérimentation ont été réalisées en suivant les protocoles des fabricants. Les voies canoniques et les fonctions biologiques associées aux gènes des différentes listes d'expression différentielle (D1 « low », D2 « medium », D3 « high ») ont été identifiées à l'aide du logiciel IPA® (Ingenuity Pathway Analysis, Qiagen).

b. Analyse des gènes codants par RNA-seq

Nous avons utilisé le sang périphérique de sujets sains (donneurs volontaires, n=8) récolté à l'EFS, sous forme de cônes de cytophérèse (sang concentré en cellules mononuclées, ~10ml de sang total/sujet). Les PBMCs du sang périphérique de ces sujets ont été fraîchement isolées du sang total par gradient de séparation Ficoll avant d'être utilisées. Les marquages intra et extracellulaires ont été réalisés en suivant le protocole ci-dessous (mix d'anticorps détaillés dans la partie « Quantification du réservoir »). Les étapes d'optimisations de ce protocole sont détaillées dans la partie Annexe 4.

b.1. Protocole optimisé pour le tri cellulaire

Matériels

- Préparer le milieu de marquage composé de PBS 1X supplémenté de 2% de SVF.
- Préparer le milieu de lavage composé de PBS 1X contenant 2% de Tryptone et 0.1% de DEPC. Après le mélange des différents composants de ce milieu, ce dernier doit être mis en agitation pendant minimum 12h à l'abri de la lumière, puis conservé à 4°C avant utilisation. Ce milieu peut être conservé une semaine à 4°C.

- Préparer de l'éthanol à 70% et le conserver à basse température (-20°C).

Remarque : Toutes les étapes de ce protocole doivent être réalisées à 4°C (tubes dans la glace), la centrifugeuse doit préalablement être réglée à 4°C et tous les milieux doivent également être utilisés et conservés à 4°C.

Méthodes

Etapes du marquage extracellulaire

- Transférer les cellules (2.10⁶ de cellules) dans un tube FACS.
- Laver une fois en ajoutant 3ml de milieu de marquage.
- Resuspendre délicatement le culot de cellules à l'aide d'une pipette, dans 20ul de milieu de marquage contenant le mixe d'anticorps extracellulaires.
- Incuber 30min à 4°C à l'abri de la lumière.
- Laver une fois dans 4ml de milieu de lavage.
- Procéder immédiatement à l'étape de fixation.

Etapes de la fixation et du marquage intracellulaire

- Après le lavage, resuspendre le culot de cellules dans 2ml d'éthanol 70% à -20°C.
- Vortexer 10 sec puis incuber 20min à -20°C à l'abri de la lumière.
- Laver trois fois (X3) les cellules dans du milieu de lavage.
- Resuspendre délicatement le culot cellulaire dans 150ul de milieu de lavage.
- Ajouter 20ul de « RNase inhibitor » et 10ul de sérum de rat (eBioscience).
- Resuspendre délicatement à l'aide d'une pipette puis incuber 10 min à 4°C à l'abri de la lumière.
- Ajouter 20ul du mixe d'anticorps intracellulaires préparés dans du milieu de lavage (en adaptant les concentrations finales des anticorps).
- Incuber 20min à 4°C à l'abri de la lumière.
- Laver deux fois (X2) dans du milieu de lavage.
- Resuspendre les cellules dans 500ul de milieu de lavage et procéder immédiatement au tri cellulaire/extraction d'ARN.

Conditions du tri cellulaire et extraction de l'ARN

Le tri des cellules doit être réalisé immédiatement après le marquage et les cellules triées doivent être récupérées dans des tubes FACS à 4°C (rack du trieur doit également être à 4°C) contenant 1ml de milieu de lavage. Les tris cellulaires ont été réalisés avec l'appareil « inFlux v7 Sorter » du fournisseur BD. A la fin des tris, la pureté cellulaire était systématiquement vérifiée pour les trois populations. Les valeurs de pureté étaient généralement comprises entre 93% et 98%. Comme mentionné auparavant (partie « Quantification du réservoir »), les cellules ont été triées selon leur expression des marqueurs CD45RO et SAMHD1 en trois sous populations cellulaires : 1- Naïves CD45RO⁻ SAMHD1⁺, 2- Mémoires CD45RO⁺ SAMHD1⁺ et 3- Mémoires CD45RO⁺ SAMHD1^{low} (voir partie « Quantification du réservoir »).

A la fin du tri, un lavage au PBS 1X à 4°C est réalisé puis le culot cellulaire est resuspendu à l'aide d'une pipette dans du tampon de lyse de type RLT (Qiagen, Courtabœuf Cedex, France) avec bêta-mercaptoéthanol (1/100). A cette étape, il est possible de conserver les lysats de cellules à -80°C ou procéder directement à l'extraction.

b.2. Analyse des gènes codants (Next Generation Sequencing, plateforme NGS)

Les ARN ont été purifiés grâce au kit « RNeasy Micro kit » de Qiagen. Les ARN ont été par la suite dosés par Quant-iT RiboGreen RNA Assay Kit et contrôlés pour leur qualité sur le Bioanalyzer (Agilent). Les valeurs des RINs étaient comprises entre 3.7 et 5.8 (Figure 9).

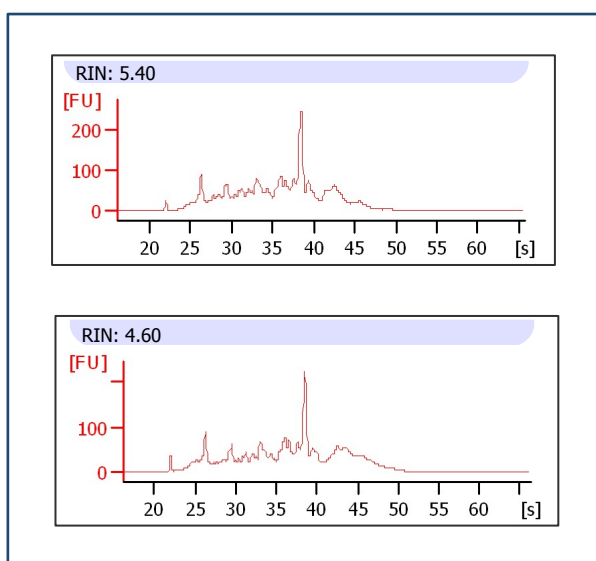


Figure 9. Exemples représentatifs de profils de qualité d'ARNs utilisés dans l'analyse des gènes codants.

Les bibliothèques ont été préparées avec le kit TruSeq® Stranded mRNA kit (Illumina). Les bibliothèques ont été dosées par PicoGreen dsDNA quantitation assay et contrôlées sur le Bioanalyzer. La clusterisation puis le séquençage ont été réalisés sur la CBot et le HiSeq 2500 V4 sequencing system, respectivement. La qualité du séquençage a été réalisée sur Sequence Analysis Viewer (SAV) et FastQC. Le Phred quality score de 30 a été retenu pour exclure les bases de faibles qualités. Les séquences ainsi filtrées ont été alignées au génome Humain de référence hg19 en utilisant le logiciel STAR 2.53a. Les transcrits ont été quantifiés grâce à l'application Partek E/M avant d'être normalisés avec la méthode Trimmed Mean of M-values (TMM). L'analyse différentielle a été réalisée avec la méthode gene-specific analysis (GSA) de Partek genomics suite software (Partek Inc., St. Louis, MO, USA). Les transcrits ayant une valeur $P \leq 0,05$ et un fold change ≥ 1.5 ont été considérés comme différentiellement exprimés. Les voies canoniques et les fonctions biologiques associées aux gènes des différentes listes d'expression différentielle (Mémoires SAMHD1⁺ vs Mémoires SAMHD1^{low}) ont été identifiées à l'aide du logiciel IPA® (Ingenuity Pathway Analysis, Qiagen).

RESULTATS

Résultats

Les lymphocytes T CD4⁺ mémoires SAMHD1^{low} sont des cellules activées.

Nous avons tout d'abord caractérisé les lymphocytes T CD4⁺ SAMHD1⁺ et SAMHD1^{low} par cytométrie en flux dans le but de déterminer le caractère d'activation, d'épuisement et de sénescence en évaluant l'expression des marqueurs CD25, PD-1 CD95, 2B4, CD57, CD27, CD28 et CD127 en ex vivo chez des individus non-infectés (VIH-1-), infectés et traités (VIH-1+ c-ART+) et infectés non-traités (VIH-1+ c-ART-).

Les résultats illustrés dans la figure 1 montrent tout d'abord la stratégie de gating que nous avons utilisée (exemples représentatifs de sujet VIH-1- et de patients VIH-1+ c-ART+ et VIH-1+ c-ART-, **Figure. 1a**). Nous avons sélectionné, au sein des PBMCs, les lymphocytes T CD3⁺ CD4⁺ vivants (Vivid-) puis, en nous basant sur l'expression des marqueurs CD45RO et SAMHD1, nous avons ciblé les cellules T CD4⁺ mémoires (CD45RO⁺) SAMHD1⁺ et mémoires (CD45RO⁺) SAMHD1^{low}.

Nous avons déterminé le caractère activé/épuisé et sénescence des cellules SAMHD1^{low} et SAMHD1⁺ dans le compartiment CD45RO⁺. Nous avons observé une proportions significativement plus élevée de cellules CD25⁺, PD-1⁺ et CD95⁺ dans le compartiment SAMHD1^{low} versus SAMHD1⁺ ($p < 0.0001$, $p < 0.01$, $p < 0.0001$ respectivement, **Figure. 1b**), tandis qu'aucune différence significative n'a été observée dans l'expression de 2B4 entre ces deux compartiments. De plus, aucunes différences dans les proportions de cellules CD57⁺ et CD27⁻CD28⁻ n'ont été notées entre ces deux compartiments. Néanmoins, nous avons noté que l'expression de CD57 et 2B4 chez les individus VIH-1- est similaire dans les compartiments SAMHD1^{low} et SAMHD1⁺. En revanche, ces expressions ont été retrouvées significativement plus élevées dans le compartiment SAMHD1⁺ par rapport à SAMHD1^{low} ($p < 0.01$) chez les patients VIH-1+.

Nos résultats ont révélé des expressions significativement plus faibles de CD127 dans le compartiment SAMHD1^{low} par rapport à SAMHD1⁺ ($p < 0,0001$, **Figure. 1d**), confirmant le phénotype effecteur et « mémoire activé » des cellules CD45RO⁺ CD25⁺ SAMHD1^{low}.

En somme, l'ensemble de ces résultats montre que les cellules mémoires SAMHD1^{low} sont des cellules activées n'exprimant pas de marqueurs de sénescence.

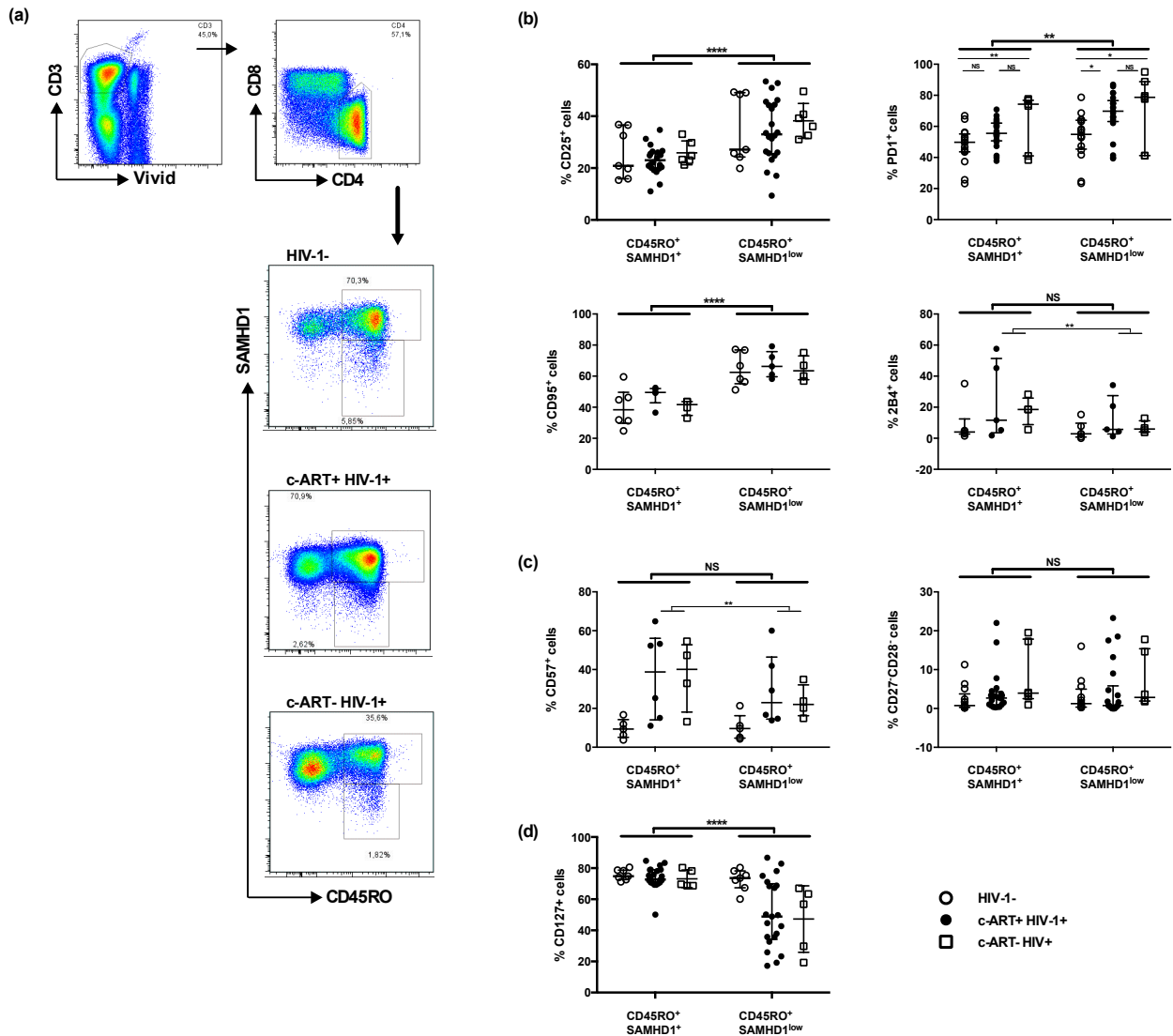


Figure 1. Les lymphocytes T CD4⁺ mémoires SAMHD1^{low} sont des cellules activées. Les PBMCs de sujets sains (VIH-1-, n=6), de sujets infectés et traités (VIH-1+ c-ART+, n=23) et non traités (VIH-1+ c-ART-, n=6) ont été marquées avec des anticorps monoclonaux anti-CD3, -CD4, -CD8, -CD45RO, -SAMHD1, -CD95, -PD-1, -CD57, -2B4, -CD25, -CD127, -CD27 et -CD28. Un marquage Vivid a été rajouté pour éliminer les cellules mortes. (a) Stratégie de gating utilisée pour isoler les lymphocytes T CD4⁺ mémoire (CD45RO⁺) SAMHD1⁺ et SAMHD1^{low} dans les trois groupes de patients. (b) Proportions de cellules PD1⁺, 2B4⁺, CD57⁺, CD95⁺, CD127⁺ et CD25⁺ dans les lymphocytes T CD4⁺ mémoires (CD45RO⁺) SAMHD1⁺ et SAMHD1^{low} dans les trois groupes de patients.

Les lymphocytes T CD4⁺ mémoires SAMHD1^{low} sont significativement diminués dans le sang périphérique et le tractus gastro-intestinal de patients infectés par le VIH-1.

Nous avons tout d'abord déterminé la fréquence des lymphocytes T CD4⁺ CD45RO⁺ mémoires SAMHD1^{low} (gating stratégie, **Figure. 2a**) dans les lymphocytes T CD3⁺ CD4⁺ vivants totaux du sang périphériques de patients VIH-1+ c-ART+ (n=17) que nous avons ensuite comparés à la fréquence retrouvée chez les sujets non infectés (n=13). Nous avons observé une diminution significative des proportions de lymphocytes T CD4⁺ CD45RO⁺ mémoires SAMHD1^{low} chez les patients VIH-1+ c-ART+ comparés aux sujets non infectés (2.97% [1.27-9.75] vs 6.79% [1.83-12.5] respectivement, P<0.001) (**Figure. 2b**). De plus, nous avons déterminé les proportions de ces cellules dans les PBMCs et les biopsies de muqueuse intestinale, récoltés à partir de 6 individus infectés et 6 individus non-infectés. La figure 2c représente la stratégie de gating que nous avons utilisés pour cibler les cellules CD45RO⁺ mémoires SAMHD1^{low} dans le sang périphérique et les biopsies rectales de patients VIH-1+ (**Figure. 2c**). Nous révélons que les lymphocytes T CD4⁺ mémoires SAMHD1^{low} sont également présents dans le tractus gastro-intestinal de sujets non-infectés et infectés par le VIH-1 (23.58% [11.1-42.5] et 7.78% [6.12-11.7] respectivement). Nous avons observé que de la même manière qu'en périphérie, les cellules mémoires SAMHD1^{low} sont significativement déplétées au cours de l'infection par le VIH-1 de manière générale (p<0.001) et dans le tractus intestinal (p<0.01). De manière importante, nous avons observé que ces cellules étaient présentes en plus grandes proportions dans le tractus gastro-intestinal que dans le sang périphérique de patients infectés par le VIH-1 (p<0.001, **Figure.2d**).

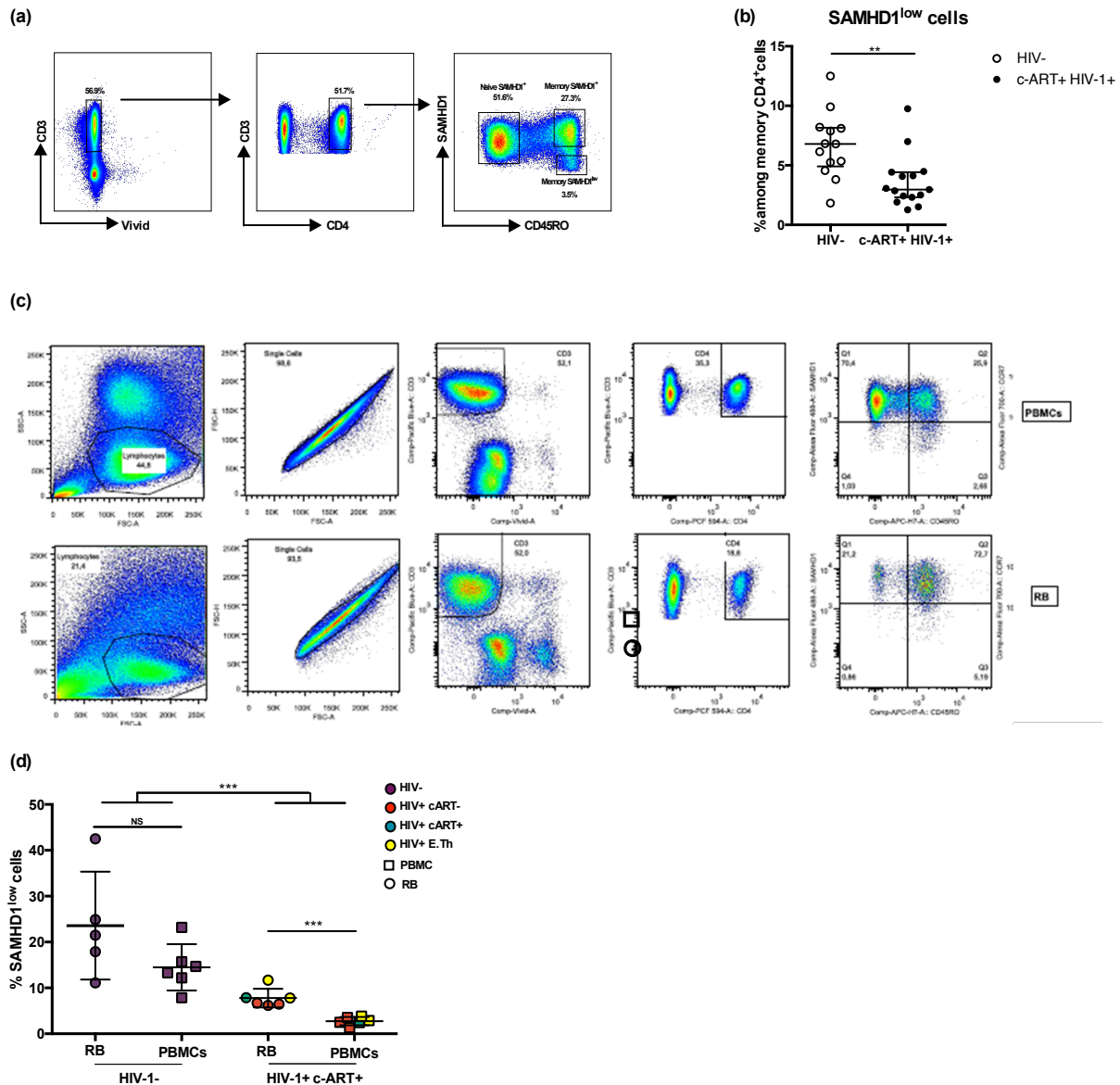


Figure 2. Les lymphocytes T CD4⁺ mémoires SAMHD1^{low} sont significativement diminuées dans le sang périphérique et le tractus gastro-intestinal de patients infectés et traités et sont présentes en plus grandes proportions dans le tractus gastro-intestinal. Les PBMCs de sujets sains (VIH-1-, n=13) et de sujets infectés et traités (VIH-1+ c-ART+, n=17) ont été marquées avec des anticorps monoclonaux anti-CD3, -CD4, -CD45RO, et -SAMHD1. Les PBMCs les lymphocytes de la lamina propria isolés à partir de biopsies rectales de sujets infectés et traités (VIH-1+ c-ART+, n=1), infectés et non traités (VIH-1+ c-ART-, n=3) et de sujets en échec thérapeutique (VIH-1+ E.Th, n=2) ont été marqués avec des anticorps monoclonaux anti-CD3, -CD4, -CD45RO, et -SAMHD1. En contrôle, les PBMCs de sujets sains (VIH-1-, n=6) et les lymphocytes de la lamina propria isolés de biopsies excisionnelles de colons de sujets VIH-1- ont été utilisées. Un marquage Vivid a été rajouté pour éliminer les cellules mortes. (a) Stratégie de gating utilisée pour isoler les lymphocytes T CD4⁺ naïves SAMHD1⁺ (CD45RO⁻ SAMHD1⁺), mémoire SAMHD1⁺ (CD45RO⁺ SAMHD1⁺) et mémoires SAMHD1^{low} (CD45RO⁺ SAMHD1^{low}). (b) Proportions de cellules T CD4⁺ mémoire (CD45RO⁺) SAMHD1^{low} chez les sujets sains et les sujets VIH-1+ c-ART+. (c) Stratégie de gating utilisée pour isoler les lymphocytes T CD4⁺ naïves SAMHD1⁺ (CD45RO⁻ SAMHD1⁺), mémoire SAMHD1⁺ (CD45RO⁺ SAMHD1⁺) et mémoires SAMHD1^{low} (CD45RO⁺ SAMHD1^{low}). (d) Proportions de cellules T CD4⁺ mémoire (CD45RO⁺) SAMHD1^{low} dans le sang total et le tractus digestif de sujets VIH-1- et de sujets VIH-1+ c-ART+. Les résultats représentent les Médianes avec interquartile. *p<0.05, **p<0.01 et ***p<0.001, t-test, one-way et 2-way ANNOVA suivis du test Bonferroni ont été réalisés.

Les lymphocytes T CD4⁺ mémoires SAMHD1^{low} sont enrichies en cellules CCR6⁺ polarisées Th17.

Nous avons précédemment démontré que les lymphocytes T CD4⁺ mémoires SAMHD1^{low} du sang périphérique étaient enrichis en cellules CCR6⁺CXCR3⁻CCR4⁺ Th17 (Ruffin, Brezar et al. 2015). Nous avons voulu déterminer si les cellules SAMHD1^{low} pouvaient aussi inclure les populations cellulaires CCR6⁺ nouvellement décrites co-exprimant ou non les deux récepteurs des chimiokines CXCR3 et CCR4. Ces deux populations sont désignées comme doubles négatives (CCR6⁺DN; CXCR3⁻CCR4⁻) et doubles positives (CCR6⁺DP; CXCR3⁺CCR4⁺) (Wacleche, Goulet et al. 2016). Les cellules CCR6⁺DN ont été décrites comme étant capables de produire de l'IL-17A à des niveaux similaires à ceux produits par les cellules Th17, tandis que les cellules CCR6⁺DP produisent de faibles niveaux d'IL-17A. Les cellules CCR6⁺ DN contiennent du VIH-1 compétent pour la réplication et leur profil transcriptionnel a révélé qu'elles exprimaient des marqueurs de développement précoce de Th17 (IL-17F, STAT3), de migration vers les ganglions lymphatiques (CCR7, CD62L) et de Tfh (CXCR5, MYC, TERC) (Wacleche, Goulet et al. 2016).

Nous avons tout d'abord déterminé les proportions des lymphocytes T CD4⁺ CD45RO⁺ SAMHD1^{low} dans les quatre sous-populations Th17 (CCR6⁺ CXCR3⁻ CCR4⁺), Th1Th17 (CCR6⁺ CXCR3⁺ CCR4⁻), CCR6⁺DN (CCR6⁺ CXCR3⁻ CCR4⁻) et CCR6⁺DP (CCR6⁺ CXCR3⁺ CCR4⁺) en utilisant la stratégie de gating illustrée dans la **figure. 3a**. Nous avons constaté que les cellules mémoires SAMHD1^{low} sont présentes dans les quatre compartiments de cellules CCR6⁺ polarisées Th17, et observé des diminutions significatives des proportions cellulaires SAMHD1^{low} dans les compartiments Th17, CCR6⁺DN et CCR6⁺ DP chez les patients VIH-1+ c-ART+ comparé aux sujets non infectés (5.07% vs 15.3%; P<0.001, 0.84% vs 1.93%; P<0.05 et 5.12% vs 8.82%; P<0.5, respectivement) (**Figure. 3b**), alors que celles-ci étaient similaires dans le compartiment Th1Th17 entre les deux groupes de patients (1.68% vs 3.63%, p>0,05).

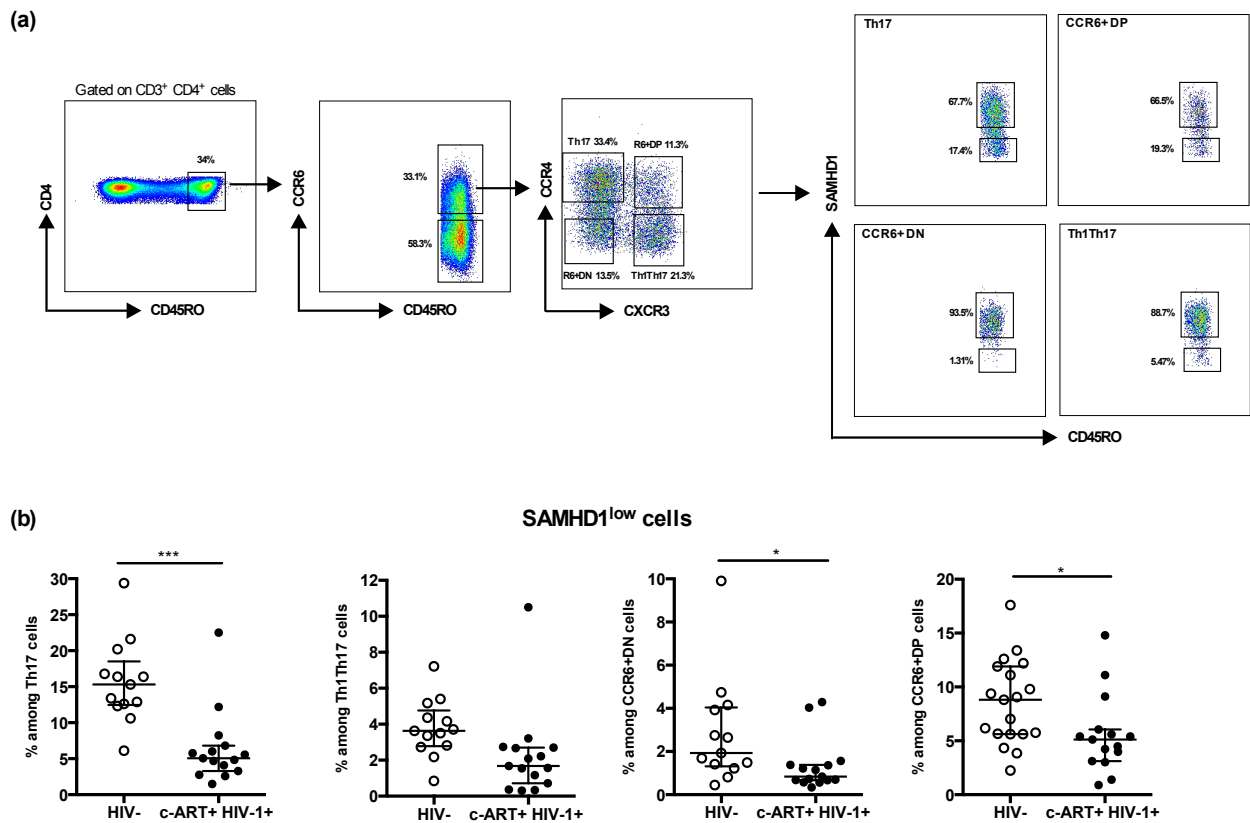


Figure 3. Les lymphocytes T CD4⁺ mémoires SAMHD1^{low} sont enrichies en cellules CCR6⁺ polarisées Th17. Les PBMCs de sujets sains (VIH-1-, n=13) et de sujets infectés et traités (VIH-1+ c-ART+, n=17) ont été marquées avec des anticorps monoclonaux anti-CD3, -CD4, -CD45RO, -CXCR3, -CCR4, -CCR6 et -SAMHD1. Un marquage Vivid a été rajouté pour éliminer les cellules mortes. (a) Stratégie de gating utilisée pour isoler les lymphocytes T CD4⁺ mémoire (CD45RO⁺) SAMHD1⁺ et SAMHD1^{low} dans les sous-populations cellulaires mémoires CCR6⁺ Th17 (Th17, CD45RO⁺CXCR3⁻CCR4⁺CCR6⁺), Th1/Th17 (CD45RO⁺CXCR3⁺CCR4⁻CCR6⁺), CCR6⁺ double positive DP (CCR6⁺CXCR3⁺CCR4⁺) et CCR6⁺ double négative DN (CCR6⁺CXCR3⁻CCR4⁻). (b) Proportions de cellules T CD4⁺ mémoire (CD45RO⁺) SAMHD1^{low} dans les CCR6⁺ Th17, Th1/17, R6⁺ (CCR6⁺) DN, R6⁺DN chez les sujets sains et les sujets VIH-1+ c-ART+. Les résultats représentent les Médianes avec interquartile. *p<0.05, **p<0.01 et ***p<0.001, t-test, one-way et 2-way ANNOVA suivis du test Bonferroni ont été réalisés.

Nous avons ensuite déterminé et comparé les proportions de ces quatre sous-populations cellulaires CCR6⁺ polarisées Th17 dans les compartiments SAMHD1⁺ et SAMHD1^{low} chez les sujets VIH-1- et VIH-1+ c-ART+. Nous avons noté un enrichissement significatif du compartiment CCR6⁺ SAMHD1^{low} en cellules Th17 comparé aux Th1Th17, CCR6⁺NP et CCR6⁺DN chez les patients VIH-1+ c-ART+ (41% [17.5-62.5] vs 15.3% [3.7-35.5], 7.95% [1.18 -22.2] et 5.62% [1.75-17.5]) respectivement, P<0.0001) (**Figure. 4a**). Une tendance similaire a été observée chez les sujets VIH-1- (55% [24.6-76.7] vs 11.8% [3.18-24.6], 8.58%

[3.35-19.7] et 3.8% [1.67-8.8]) respectivement, $P < 0.0001$). Ces résultats sont en corrélation avec ceux obtenus précédemment dans le laboratoire (Ruffin, Brezar et al. 2015).

De manière intéressante, nous avons observé une diminution significative des proportions de cellules Th17 dans le compartiment SAMHD1^{low} chez les patients VIH-1+ c-ART+ comparés aux sujets non infectés (41% [17.5-62.5] vs 55% [24.6-76.7], $p < 0.05$), à l'inverse des cellules CCR6⁺DN dont les proportions ont significativement augmenté (7.95% [1.18-22.2] vs 3.8% [1.67-8.8], $p < 0.05$) (**Figure. 4b, Figure. 4c**). Dans le compartiment SAMHD1⁺, aucune différence dans les proportions de Th17 n'a été observée entre les patients VIH-1+ c-ART+ et les sujets VIH-1- (17.9% [6.71-35] vs 25.1% [9.5-47.2], $p > 0.05$). En revanche, les proportions de cellules CCR6⁺DN ont significativement augmenté (24.8% [10.8-35] vs 14.7% [6.38-28.4] $p < 0.05$) (**Figure. 4b, Figure. 4c**).

Ces résultats démontrent que les cellules Th17 et CCR6⁺DN, deux populations majeures susceptibles à l'infection par le VIH-1, sont présentes dans le compartiment SAMHD1^{low}. De plus, ces résultats suggèrent que les lymphocytes T CD4⁺ CD45RO⁺ mémoires SAMHD1^{low} représentent une population cible pour le VIH-1, vu qu'on assiste à une diminution significative de ces cellules chez les patients VIH-1+ c-ART+ par rapport aux sujets non infectés.

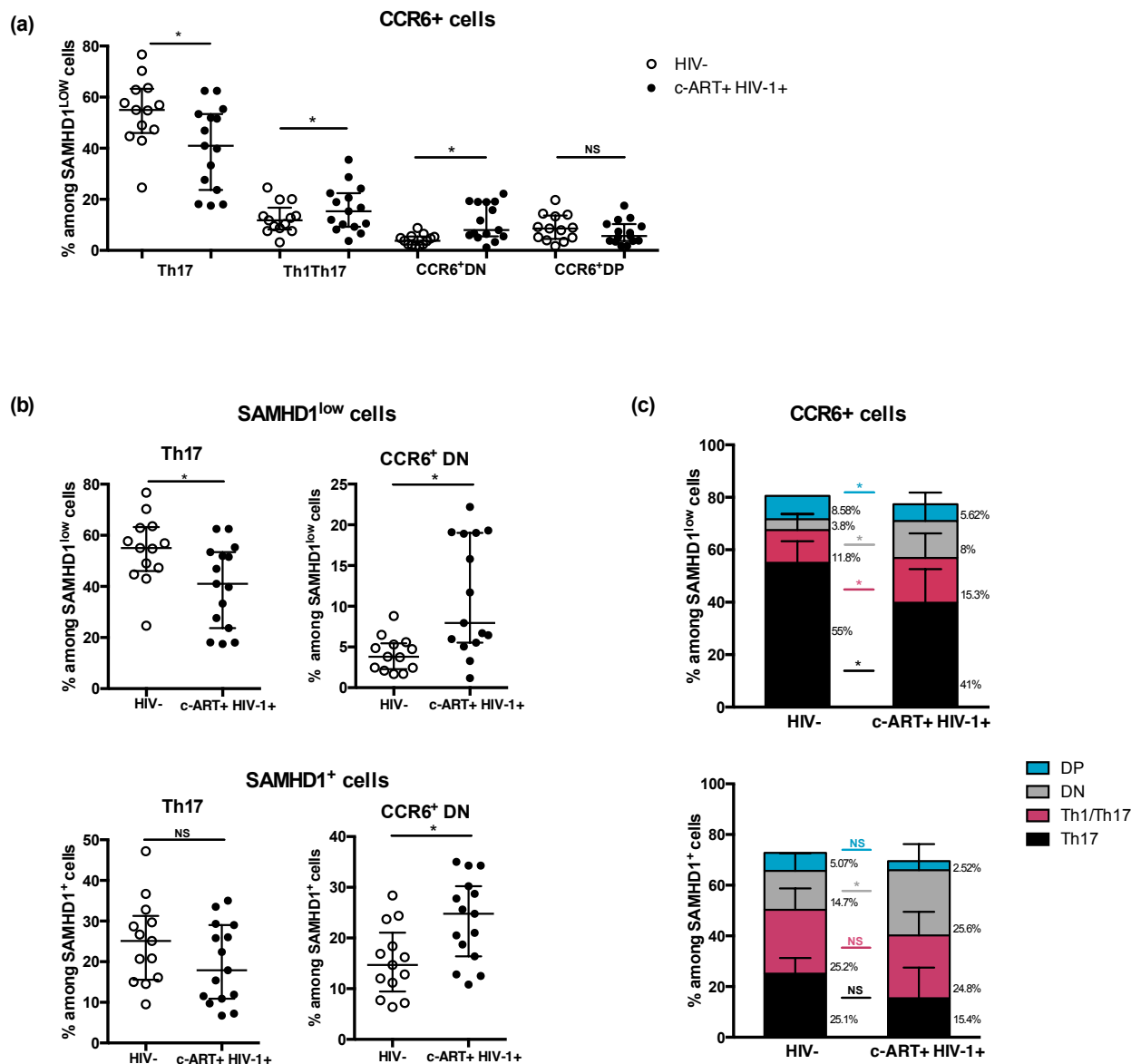


Figure 4. Les lymphocytes T CD4⁺ mémoires SAMHD1^{low} sont enrichies en cellules CCR6⁺ Th17. (a) Proportions de cellules CCR6⁺ Th17, Th1/17, R6⁺ (CCR6⁺) DN, R6⁺DN dans les cellules T CD4⁺ mémoire (CD45RO⁺) SAMHD1^{low} chez les sujets sains et les sujets VIH-1+ c-ART+. (b) Proportions de cellules CCR6⁺ Th17 et R6⁺ DN dans les cellules T CD4⁺ mémoire SAMHD1⁺ et SAMHD1^{low} chez les sujets sains et les sujets VIH-1+ c-ART+. (c) proportions de CCR6⁺ Th17, Th1/17, R6⁺DP et R6⁺DN dans les cellules mémoires SAMHD1⁺ et SAMHD1^{low} chez les sujets sains et les sujets VIH-1+ c-ART+. Les résultats représentent les Médianes avec interquartile. *p<0.05, **p<0.01 et ***p<0.001, t-test, one-way et 2-way ANNOVA suivis du test Bonferroni ont été réalisés.

Les lymphocytes T CD4⁺ mémoires SAMHD1^{low} contiennent des niveaux élevés d'ADN VIH-1 total.

Comme décrit précédemment, l'expression différentielle des deux marqueurs SAMHD1 et CD45RO nous permettent de distinguer les lymphocytes T CD4⁺ mémoires CD45RO⁺SAMHD1⁺, CD45RO⁺SAMHD1^{low} et les lymphocytes T CD4⁺ naïfs CD45RO⁻SAMHD1⁺ (Ruffin, Brezar et al. 2015). Nous avons émis l'hypothèse que les cellules SAMHD1^{low}, qui sont enrichies en cellules Th17 et CCR6⁺DN, contiendraient des niveaux élevés d'ADN VIH-1 total.

En vue de la quantification du réservoir (ADN VIH-1 total), nous avons trié par FACS les cellules naïves SAMHD1⁺, mémoires SAMHD1⁺ et mémoires SAMHD1^{low} (**Figure. 5a**). Compte tenu de l'expression intracellulaire de SAMHD1, il était indispensable de procéder à une fixation et une perméabilisation des cellules. Nous avons donc développé des protocoles appropriés pour l'extraction d'acides nucléiques et pour les expériences de PCR quantitative pour la quantification de l'ADN VIH-1 total extrait de cellules fixées/perméabilisées, comme détaillé dans la partie « Matériel et méthodes ».

Nous avons tout d'abord testé nos protocoles en utilisant des cellules PBMCs non fixées et fixées/perméabilisées de 10 patients VIH-1+ c-ART+ pour quantifier et comparer les taux d'ADN VIH-1 total, avec une limite de détection de 3 copies/PCR. Nous avons exprimé chaque valeur en nombre de copies d'ADN VIH-1 par million de cellules.

Les résultats montrent que les PBMCs non fixées et fixées/perméabilisées contiennent des taux équivalents d'ADN VIH-1 (**Figure. 5b. Gauche**, médiane: 1524.07 [179-2947.2] vs 1159.48 [59.31-3487] copies/10⁶ cellules, respectivement, p=0.6520). De plus, les taux d'ADN VIH-1 de PBMCs non fixées et de PBMCs fixées/perméabilisées sont significativement corrélés, indiquant ainsi la fiabilité de nos protocoles (r= 0.96, p<0.0001, **Figure. 5b. Droite**). Nous avons ensuite mesuré puis comparé les taux d'ADN VIH-1 de lymphocytes T CD4⁺ CD45RO⁺ mémoires et CD45RO⁻ naïfs triés du même groupe de patients, et comme attendu, les lymphocytes T CD4⁺ CD45RO⁺ mémoires fixés présentaient des taux significativement plus élevés d'ADN VIH-1 comparés aux cellules CD45RO⁻ naïves fixées (médiane: 5312.43 [792.55-41939] vs 1168.65 [40-12149.21] copies/10⁶ cellules,

respectivement, $p=0.0029$, **Figure. 5c**), indiquant une fois de plus la fiabilité des protocoles établis pour quantifier l'ADN VIH-1 à partir de lymphocytes T CD4⁺ SAMHD1⁺ et SAMHD1^{low} fixés/perméabilisés et triés.

Nous avons ensuite quantifié l'ADN VIH-1 total afin de déterminer si les cellules SAMHD1^{low} présentaient des niveaux plus élevés d'ADN viral en comparaison aux cellules SAMHD1⁺ chez des patients VIH-1+ ($n=36$), en utilisant les protocoles développés.

Nous avons observé que les cellules mémoires SAMHD1^{low} de patients VIH-1+ c-ART+ ($n=30$) présentaient des niveaux significativement plus élevés d'ADN VIH-1 total comparé aux cellules mémoires SAMHD1⁺ (4.5 [3.1-6.2] vs 3.8 [2.9-5.7] log/10⁶ cellules, respectivement, $p=0.009$), tandis que les cellules naïves SAMHD1⁺ présentaient les niveaux les plus bas (3.1 [1.6-4.4], $p<0.0001$ et $p=0.006$ vs cellules mémoires SAMHD1^{low} et SAMHD1⁺ respectivement) (**Figure. 5d**). Comme attendu, dans le groupe de patients Elite Controllers (EC, $n=6$), les deux compartiments SAMHD1⁺ et SAMHD1^{low} présentent des taux bas d'ADN VIH-1 (1.6 et 2.3 log/10⁶ cellules, respectivement, $p>0.05$) (**Figure. 5e**). Par ailleurs, nous avons noté que les cellules naïves SAMHD1⁺ de patients EC renferment des niveaux significativement plus bas d'ADN VIH-1 comparé aux cellules naïves SAMHD1⁺ de patients VIH-1+ c-ART+ (1.6 et 3.1 log/10⁶ cellules, respectivement, $p=0.001$) (**Figure. 5f**). Il est important de noter que nous n'avons pas trouvé de lien entre les niveaux d'ADN VIH-1 total et les caractéristiques cliniques des patients VIH-1+ (sexe, âge, durée sous c-ART, nadir CD4).

Globalement, ces résultats identifient les lymphocytes T CD4⁺ mémoires SAMHD1^{low} comme une nouvelle sous-population de cellules hébergeant des taux élevés d'ADN VIH-1 au sein des cellules mémoire, contribuant ainsi au réservoir du VIH-1.

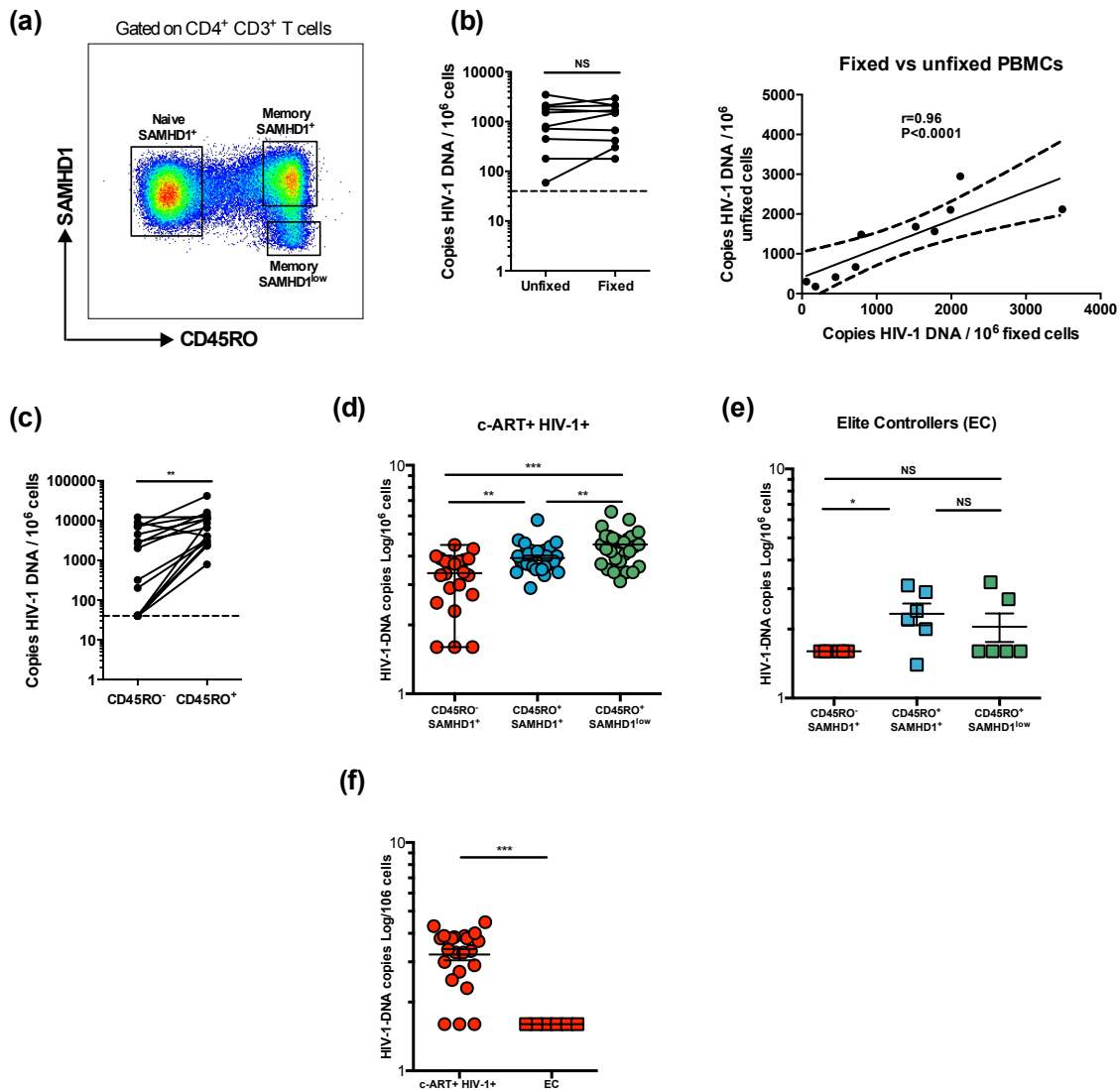


Figure 5. Les lymphocytes T CD4⁺ mémoires SAMHD1^{low} contiennent plus d'ADN-VIH-1 total comparés aux lymphocytes T CD4⁺ mémoires SAMHD1⁺. Le sang périphérique de 36 sujets VIH-1+ c-ART+ et 6 Elite Controller a été collecté. Les PBMCs ont été marqués avec des anticorps monoclonaux anti-CD3, -CD4, -CD45RO et -SAMHD1 puis les trois sous-populations : T CD4⁺ CD45RO⁺ SAMHD1^{low}, T CD4⁺ CD45RO⁺ SAMHD1⁺ et T CD4⁺ CD45RO⁻ SAMHD1⁺ ont été triées par FACS. Les protocoles d'extraction d'ADN et de PCR ont été optimisés en utilisant les PBMCs de 10 sujets VIH-1+ c-ART+. L'ADN total du VIH-1 a été quantifié dans les cellules triées ex vivo par RT PCR Nested. (a) Stratégie de gating utilisée pour le tri des cellules T CD4⁺ CD45RO⁺ SAMHD1^{low}, T CD4⁺ CD45RO⁺ SAMHD1⁺ et T CD4⁺ CD45RO⁻ SAMHD1⁺. (b) Valeurs d'ADN-VIH-1 total dans les PBMCs fixées et non-fixées de sujets VIH-1+ c-ART+. (c) Valeurs d'ADN-VIH-1 total dans les cellules mémoires (CD45RO⁺) et naïves (CD45RO⁻) triées de sujets VIH-1+ c-ART+. (d) Valeurs d'ADN-VIH-1 total dans les cellules T CD4⁺ CD45RO⁺ SAMHD1^{low}, T CD4⁺ CD45RO⁺ SAMHD1⁺ et T CD4⁺ CD45RO⁻ SAMHD1⁺ triées de sujets VIH-1+ c-ART+. (e) Valeurs d'ADN-VIH-1 total dans les cellules T CD4⁺ CD45RO⁺ SAMHD1^{low}, T CD4⁺ CD45RO⁺ SAMHD1⁺ et T CD4⁺ CD45RO⁻ SAMHD1⁺ triées de sujets Elite Controllers (EC). (f) Valeurs d'ADN-VIH-1 total dans les cellules naïves T CD4⁺ CD45RO⁻ SAMHD1⁺ triées de sujets Elite Controllers (EC) et de sujets VIH-1+ c-ART+. *p<0.05, **p<0.01 et ***p<0.001, t-test, one-way et 2-way ANNOVA suivis du test Bonferroni ont été réalisés.

Compartimentation des séquences virales dans les lymphocytes T CD4⁺ SAMHD1^{low} et SAMHD1⁺.

Le VIH-1 infecte et se dissémine rapidement dans les lymphocytes T CD4⁺, constituant ainsi un réservoir qui ensemence d'autres compartiments cellulaires et tissulaires dès que le traitement antirétroviral c-ART est interrompu (Kulpa et Chomont, 2015). De ce fait, il nous a semblé important d'identifier et de comparer les séquences du VIH-1 entre les sous-populations de cellules mémoires SAMHD1^{low} et SAMHD1⁺, ainsi que les sous-populations naïves SAMHD1⁺, ce qui permettrait de fournir des informations importantes sur l'échange viral et la propagation du virus entre les sous-populations cellulaires T CD4⁺.

Pour aborder cet aspect, nous avons réalisé un séquençage à haut débit (UDS, Ultra-Deep-Sequencing, 454 / Roche) de la boucle C2V3 du gène d'enveloppe env, à partir de l'ADN VIH-1 isolé de cellules T CD4⁺ mémoire SAMHD1^{low} et SAMHD1⁺, et naïves SAMHD1⁺, de 12 patients VIH-1+ c-ART+. Nous avons sélectionné et illustré graphiquement sous forme d'arbres phylogénétiques, les haplotypes détectés dans chacune des trois sous-populations cellulaires (**Figures. 6 et Figure. 7**).

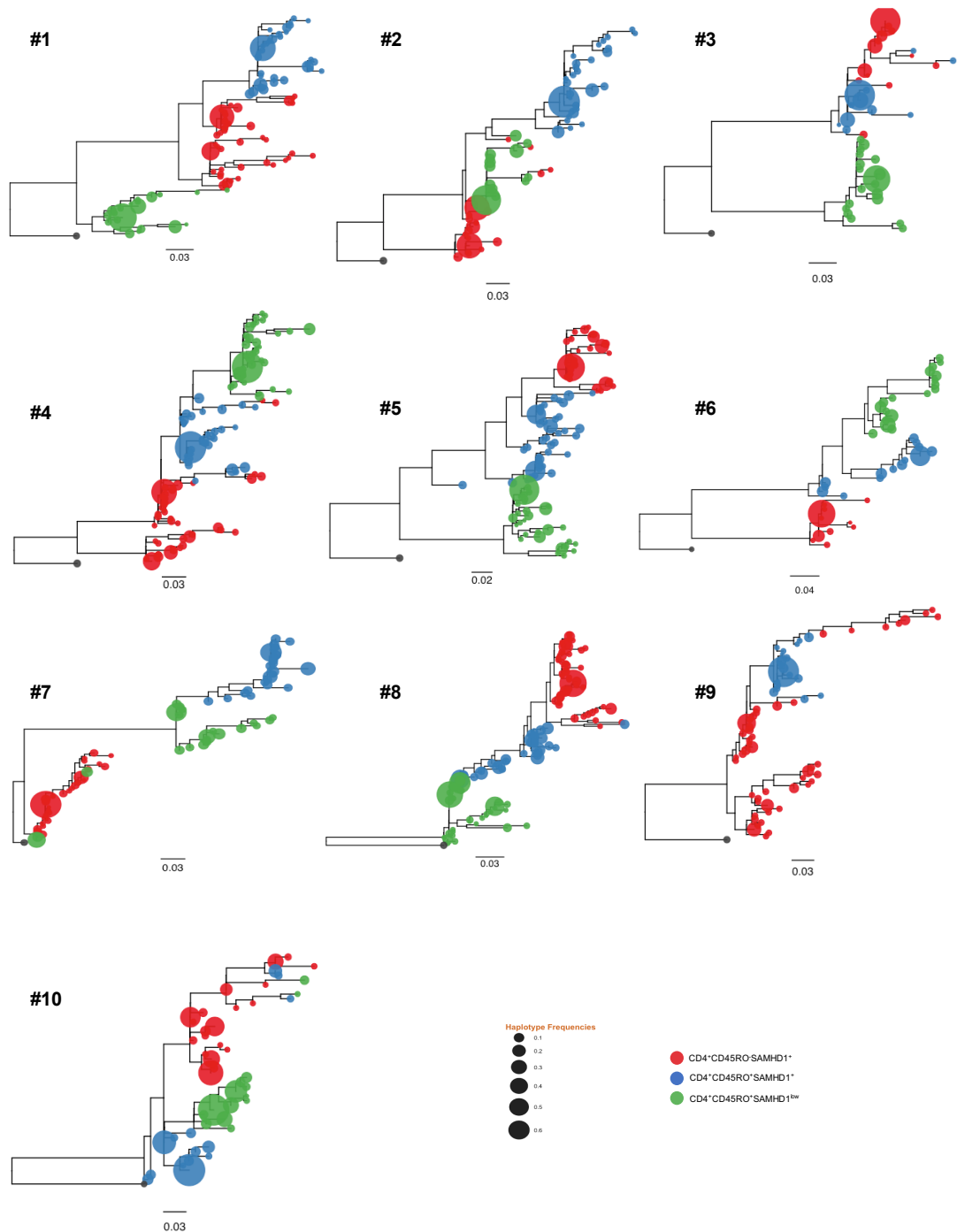


Figure 6. Arbres phylogénétiques construits à partir des séquences ADN VIH-1 isolés à partir de cellules mémoires CD4⁺ CD45RO⁺ SAMHD1^{low}, CD4⁺ CD45RO⁺ SAMHD1⁺ et naïves CD4⁺ CD45RO⁻ SAMHD1⁺, représentant la compartimentation des haplotypes chez 10/12 sujets étudiés. Un séquençage à haut débit (Ultra-deep-sequencing, UDS, 454/Roche) de la boucle C2V3 du gène d'enveloppe *env* a été réalisé sur n=12 sujets VIH-1+ c-ART+. Les séquences *Env* des cellules naïves CD4⁺CD45RO⁻SAMHD1⁺, mémoires CD4⁺CD45RO⁺SAMHD1⁺ et CD4⁺CD45RO⁺SAMHD1^{low} sont représentées en rouge, bleu et vert, respectivement. Les résultats de 10 sujets parmi les 12 étudiés, sont représentés sur cette figure. Les arbres sont enracinés à partir de la séquence de référence du gène de l'enveloppe de la souche virale HXB2. La distance génétique est indiquée par une barre d'échelle (nombre de nucléotides par site). La taille des symboles est proportionnelle à la fréquence des haplotypes.

L'analyse des arbres phylogénétiques a révélé que les haplotypes appartenant aux mêmes sous-populations cellulaires, représentés dans une même couleur sur les arbres (Vert pour les mémoires SAMHD1^{low}, Bleu pour les mémoires SAMHD1⁺ et Rouge pour les naïves SAMHD1⁺), étaient peu distants les uns des autres et tous groupés autour de l'haplotype majoritaire. De manière intéressante, les résultats d'analyses phylogénétiques ont également révélé qu'il existe une compartimentation des populations d'ADN VIH-1 qui est bien mise en évidence pour les séquences virales des cellules mémoire SAMHD1^{low} et SAMHD1⁺, et naïves SAMHD1⁺ (Figure. 6). Sur les arbres phylogénétiques, ces populations d'ADN VIH-1 paraissent relativement distinctes les unes des autres, distantes entre elles et séparées par des distances génétiques conséquentes chez 10 patients parmi les 12 patients étudiés (p<0,001) (Figure. 6).

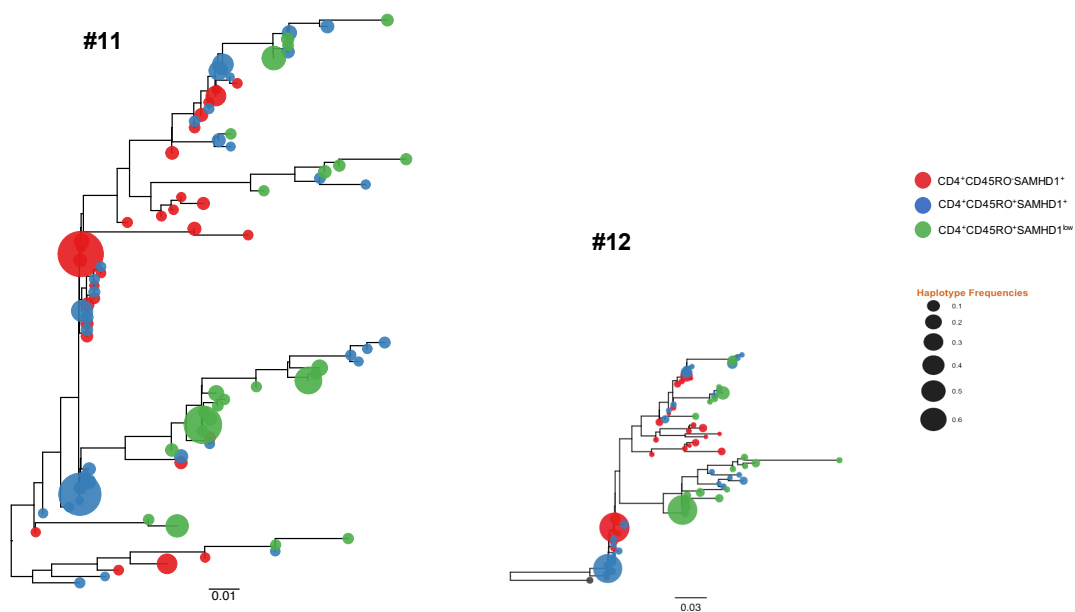


Figure 7. Arbres phylogénétiques construits à partir des séquences ADN VIH-1 isolés de cellules mémoires CD4⁺ CD45RO⁺ SAMHD1^{low}, CD4⁺ CD45RO⁺ SAMHD1⁺ et naïves CD4⁺ CD45RO⁻ SAMHD1⁺ de 2 sujets étudiés, ne présentant pas de compartimentation des haplotypes. Un séquençage à haut débit (Ultra-deep-sequencing, UDS, 454/Roche) de la boucle C2V3 du gène d'enveloppe *env* a été réalisé sur n=12 sujets VIH-1+ c-ART+. Les séquences *Env* des cellules naïves CD4⁺CD45RO⁻SAMHD1⁺, mémoires CD4⁺CD45RO⁺SAMHD1⁺ et CD4⁺CD45RO⁺SAMHD1^{low} sont représentées en rouge, bleu et vert, respectivement. Les résultats de 2 sujets parmi les 12 étudiés, sont représentés sur cette figure. Les arbres sont enracinés à partir de la séquence de référence du gène de l'enveloppe de la souche virale HXB2. La distance génétique est indiquée par une barre d'échelle (nombre de nucléotides par site). La taille des symboles est proportionnelle à la fréquence des haplotypes.

Les tests FST et Slatkin Maddison et la robustesse des valeurs de bootstraps attestent de la solidité statistique des branches représentées et confirment cette compartimentation significative entre les virus des cellules mémoire SAMHD1^{low} et SAMHD1⁺, et naïves SAMHD1⁺ chez tous les patients étudiés excepté deux d'en eux (patients #11 et #12, **Figure. 7**). En effet, chez ces deux patients, aucune compartimentation ne semble mise en évidence graphiquement avec des haplotypes des trois sous-populations tous mêlés les uns aux autres (**Figure. 7**).

Les niveaux d'ADN HIV-1 corrélient positivement avec les niveaux d'expression de Ki67 dans les lymphocytes T CD4⁺ mémoire SAMHD1^{low}.

Il a été démontré que la fréquence des lymphocytes T CD4⁺ ayant intégré un ADN du VIH-1 est associée à la fréquence de prolifération des lymphocytes T CD4⁺ mesurée par Ki67 (Chomont, El-Far et al. 2009). Dans notre précédente étude, nous avons démontré que les lymphocytes T CD4⁺ SAMHD1^{low} du sang périphérique étaient enrichis en cellules cycliques (Ruffin, Brezar et al. 2015). Nous avons donc décidé d'évaluer l'expression de Ki67 chez des patients inclus dans notre étude afin de déterminer s'il existe une relation entre les niveaux d'ADN VIH-1 et les niveaux d'expression de Ki67 dans les cellules T CD4⁺ mémoire SAMHD1^{low} et SAMHD1⁺ (**Figure. 8a**).

Tout d'abord, nous avons évalué l'expression de Ki67 chez les patients VIH-1 c-ART+. Comme attendu, nous avons confirmé que la proportion de cellules cycliques Ki67⁺ est significativement plus élevée dans le compartiment de cellules mémoires SAMHD1^{low} comparé aux cellules mémoires SAMHD1⁺ et naïves SAMHD1⁺ (15.2% [8.56-56.8] vs 3.37% [1.76-8.81] et 0.23% [0-0.79] respectivement, $p < 0.0001$) (**Figure. 8a** et **Figure 8b**).

Nous avons ensuite déterminé s'il existe une relation entre les niveaux d'ADN VIH-1 et les niveaux d'expression de Ki67 dans les cellules T CD4⁺ mémoire SAMHD1^{low} et SAMHD1⁺ et les cellules naïves SAMHD1⁺. Nous avons observé une corrélation positive et significative ($r = +0.68$, $p < 0.05$, **Figure. 8c Haut Gauche**) entre les niveaux d'ADN VIH-1 et les niveaux d'expression de Ki67 dans les cellules mémoires SAMHD1^{low}, tandis qu'aucune corrélation n'a été notée dans les cellules mémoires SAMHD1⁺ et naïves SAMHD1⁺ ($r = +0.05$ et $r = +0.04$ respectivement, $p > 0.05$, **Figure. 8c Haut Droite** et **Figure. 8c Bas**).

Ces résultats appuient le concept de prolifération en tant que mécanisme de persistance virale dans les lymphocytes T CD4⁺ en mémoire dans le sang périphérique.

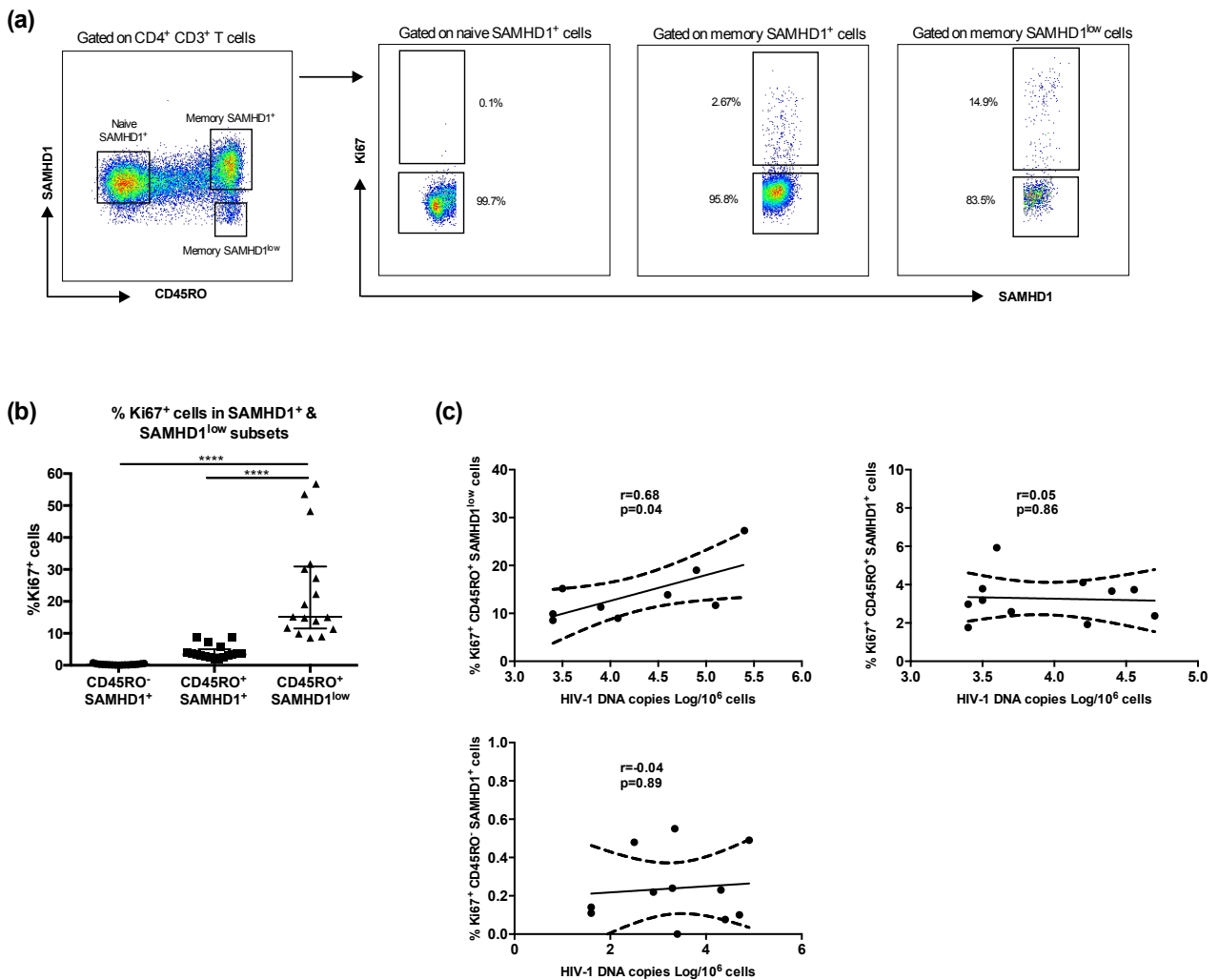


Figure 8. Les niveaux d'ADN VIH-1 total sont positivement corrélés à l'expression de Ki67 dans les cellules mémoires SAMHD1^{low}. Les PBMCs de sujets VIH-1+ c-ART+ (n=17) ont été marquées avec des anticorps monoclonaux anti-CD3, -CD4, -CD45RO, Ki67 et -SAMHD1. Un marquage Vivid a été rajouté pour éliminer les cellules mortes. (a) Stratégie de gating utilisée pour identifier les cellules Ki67⁺ et Ki67⁻ dans les cellules naïves SAMHD1⁺ (CD45RO⁻ SAMHD1⁺), mémoires SAMHD1⁺ (CD45RO⁺ SAMHD1⁺) et mémoires SAMHD1^{low} (CD45RO⁺ SAMHD1^{low}). (b) Pourcentages de cellules Ki67⁺ dans des compartiments SAMHD1⁺ and SAMHD1^{low}. (c) Corrélations entre les niveaux d'ADN VIH-1 total et l'expression de Ki67 dans les cellules naïves SAMHD1⁺ (CD45RO⁻ SAMHD1⁺), mémoires SAMHD1⁺ (CD45RO⁺ SAMHD1⁺) et mémoires SAMHD1^{low} (CD45RO⁺ SAMHD1^{low}). *p<0.05, **p<0.01 et ***p<0.001, t-test, one-way et 2-way ANNOVA suivis du test Bonferroni ont été réalisés.

Analyse des profils transcriptionnels

Dans notre étude précédente, nous avons montré que les lymphocytes T CD4⁺ qui prolifèrent in vitro voient leur expression de SAMHD1 diminuer (Ruffin, Brezar et al. 2015). En nous basant sur le caractère prolifératif des cellules mémoires CD45RO⁺ SAMHD1^{low}, nous avons voulu exploiter ce caractère de modulation de l'expression de SAMHD1 in vitro dans le but d'identifier des marqueurs extracellulaires qui permettraient de trier les cellules SAMHD1^{low} sans devoir les fixer/perméabiliser.

Nous avons donc activé des lymphocytes T CD4⁺ de sujets sains (n=4) in vitro préalablement marqués au CFSE (Carboxyfluorescein Succinimidyl Ester, marqueur de division cellulaire) et nous avons émis l'hypothèse que les cellules SAMHD1^{low} seraient contenues dans le pool de cellules ayant subi 3 à 4 divisions cellulaires. La **figure. 9a** représente la stratégie de gating que nous avons utilisée pour trier les cellules à différents stades de division D1, D2 et D3 correspondant à des cellules qui se sont très peu ou pas divisées, moyennement divisées et hautement divisées respectivement. Nous avons ensuite extrait l'ARN de ces cellules et analysé leur profil transcriptionnel (PT) de gènes codants, sur des puces à ADN.

Tout d'abord, nous avons confirmé au niveau moléculaire que les cellules SAMHD1^{low} sont bien comprises dans le pool D3 par qRT-PCR sur les ARNs extraits des pools D1, D2 et D3. Nous avons observé une baisse d'expression de SAMHD1 entre D1 et D3 (**Figure. 9b**) confirmant ainsi l'hypothèse que nous avons émise, basée sur nos résultats précédents portant sur le fait que l'expression de SAMHD1 diminuait avec la division cellulaire. L'analyse des PT nous a permis de sélectionner une liste de 26 gènes impliqués dans le cycle cellulaire. Nous avons observé que plus de 50% de ces gènes (14/26 gènes) sont surexprimés dans les cellules SAMHD1^{low} (D3) par rapport aux cellules SAMHD1⁺ (D1) (**Figure. 9c**) confirmant ainsi le caractère cyclique des cellules SAMHD1^{low}.

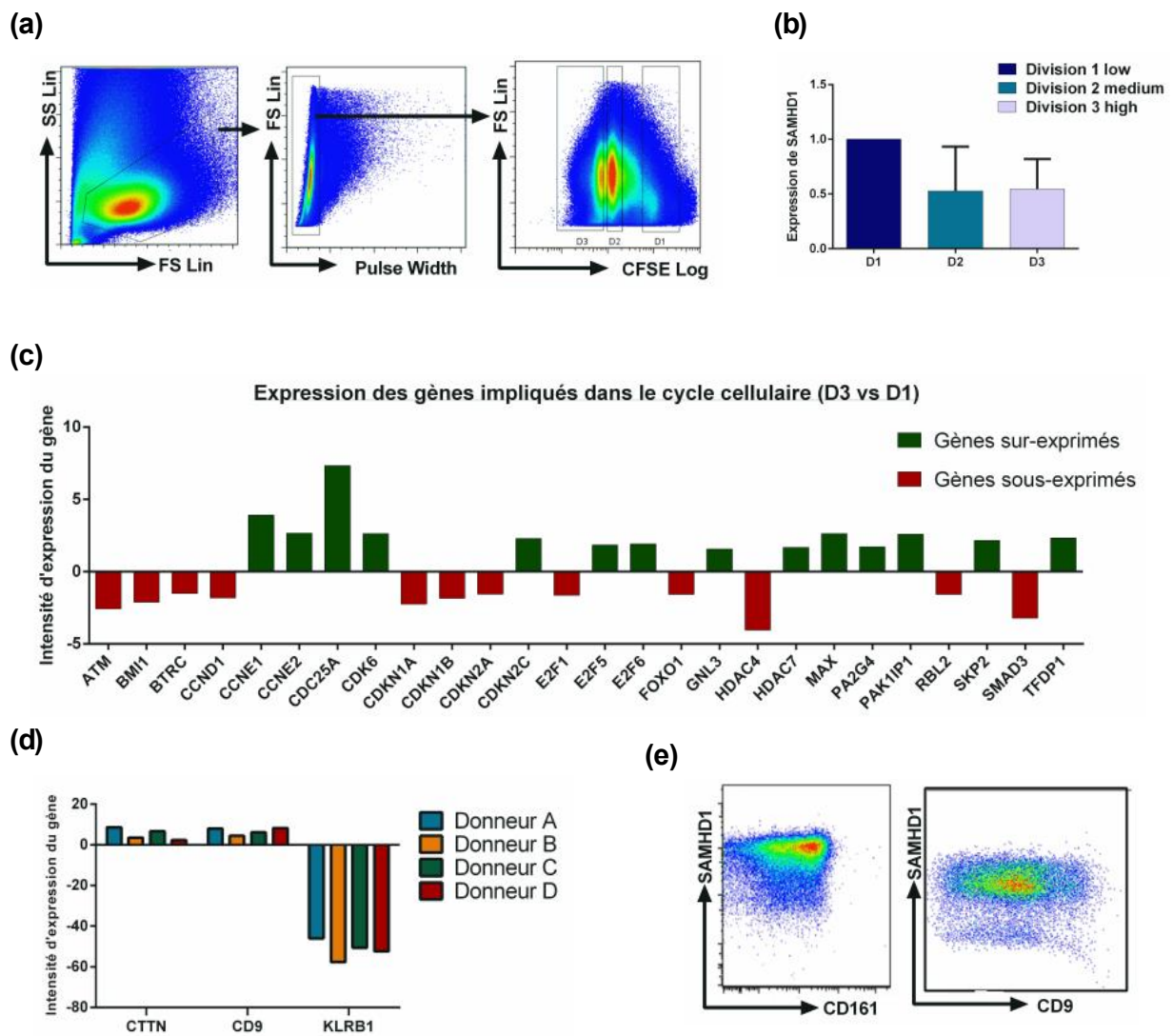


Figure 9. Analyse du profil transcriptionnel (PT) de cellules T CD4⁺ ayant subi plusieurs divisions *in vitro*. Les cellules T CD3⁺ CD4⁺ de sujets VIH-1- (n=4) ont été marquées au CFSE et activés avec des anticorps anti-CD3 et anti-CD28 pendant une durée de 4 jours, puis triés dans le but d'obtenir trois sous-populations basées sur leur degré de division *in vitro*: Division 3, D3 (high), D2 (medium), D1 (low). Une purification d'ARNs a été réalisée sur les 3 sous-populations cellulaires D3, D2 et D1 de chacun des donneurs, suivie d'une analyse du profil transcriptionnel de chaque groupe (D1, D2 et D3) sur puces à ADN. (a). DotPlot représentatif d'un marquage CFSE. (b). Expression du gène SAMHD1 dans les sous-populations D3, D2 et D1 mesurée par q-RT-PCR. (c). Différence d'intensité d'expression de gènes impliqués dans le cycle cellulaire entre D3 et D1. (d). Intensité d'expression des gènes CTTN, CD9 et KLRB1 chez chaque donneur. (e). Plots représentatifs de marquages SAMHD1/CD161 et SAMHD1/CD9 réalisé sur des lymphocytes T CD4⁺ de sujets VIH-1-.

Comme notre but initial était d'identifier des marqueurs membranaires caractérisant les cellules SAMHD1^{low} qui nous permettrait ensuite de les trier sans devoir les fixer/perméabiliser, nous avons étudié la liste de gènes exprimés différemment entre les cellules SAMHD1^{low} et les cellules SAMHD1⁺ et avons identifié trois gènes dont l'expression protéique est membranaire. Ces trois gènes sont CTTN, CD9 et KLRB1. La CTTN ou Cortactin pour « Cortical Actin Binding Proteine », est une protéine membranaire qui favorise la polymérisation et le réarrangement du cytosquelette d'actine. Le marqueur CD9 est une tetraspanine, une glycoprotéine de surface dont la fonction moléculaire n'a pas encore été déterminée et aucun ligand ne lui a été décrit. Néanmoins, il a été montré que le CD9 jouait un rôle dans la fusion membranaire cellule/VIH-1 (Gordon-Alonso, Yanez-Mo et al. 2006). Le KLRB1, pour « Killer Cell Lectin-like Receptor subfamily B, Membrane 1 », aussi connu comme le CD161, est une glycoprotéine exprimée à la surface des cellules NK (Natural Killer).

L'expression de ces trois gènes sur les cellules SAMHD1^{low} est similaire et reproductible chez les quatre donneurs inclus dans l'analyse (**Figure. 9d**) Les gènes CTTN et CD9 sont sur-exprimés sur les cellules SAMHD1^{low} tandis que le gène KLRB1 est significativement sous-exprimé. L'utilisation d'anticorps anti-CD9 et anti-CD161 dans des expériences de marquages en cytométrie en flux s'est avérée peu concluante pour isoler les cellules SAMHD1^{low}. En effet, nous avons observé que les cellules SAMHD1^{low} sont réparties dans les compartiments CD9⁺ et CD9⁻, de la même manière que pour les compartiments CD161⁺ et CD161⁻ (**Figure. 9e**).

L'ensemble de ces résultats indique que les cellules SAMHD1^{low} sont bien comprises dans le pool de cellules hautement divisées, cependant, cette dernière ne représente pas une population pure et suffisamment homogène. De plus, il nous a semblé plus judicieux et pertinent de baser l'analyse des PT des cellules SAMHD1^{low} sur l'expression des marqueurs CD45RO et SAMHD1 afin de caractériser ces cellules au niveau moléculaire.

Dans ce sens, nous avons optimisé un protocole d'extraction d'ARN de qualité suffisante pour réaliser une analyse de PT, à partir de cellules fixées/perméabilisées. L'étape de fixation/perméabilisation des cellules a induit une dégradation majeure de la qualité des ARNs. Celle-ci a été évaluée grâce aux valeurs très basses de RIN obtenues (RNA Integrity

Number, valeur liée à la présence des ARN ribosomiaux 18S et 28S). Comme détaillé dans le chapitre « matériels et méthodes », nous avons testé diverses techniques d'extraction d'ARN, de traitements permettant de préserver l'intégrité de l'ARN et de techniques de fixation/perméabilisation. Le protocole que nous avons optimisé nous a permis d'extraire des ARNs à partir de cellules fixées/perméabilisées dont les valeurs de RIN sont comprises entre 3.7 et 5.8. Dans des conditions optimales, des valeurs de $RIN \geq 7$ sont souvent utilisées comme références. Bien que nos conditions restent insuffisantes pour atteindre ces conditions optimales, nous sommes parvenus à améliorer de manière considérable la qualité des ARNs extraits à partir de cellules fixées/perméabilisées, lesquels présentaient des RINs médiocres à indétectables ($RIN < 2.3$).

Nous avons donc décidé de réaliser une analyse de PT en utilisant la plateforme NGS (Next Generation Sequencing). Nous avons utilisé les ARNs extraits de cellules mémoires SAMHD1⁺ et SAMHD1^{low} triés sur la base de l'expression des marqueurs CD45RO et SAMHD1 de sujets VIH-1- (n=8), et suivant les étapes du protocole que nous avons optimisées. Après les premières étapes d'analyse et de contrôle qualité, nous avons pu retenir les données des cellules SAMHD1^{low} de 3 sujets et des cellules SAMHD1⁺ de 6 sujets parmi les 8 étudiés, sélectionnés sur la base de la quantité et de la qualité des échantillons. La figure (**Figure. 10**) est une représentation PCA (Principal Component Analysis) indiquant la distribution des cellules SAMHD1⁺ et SAMHD1^{low} selon leurs PT, et permet clairement de distinguer les cellules SAMHD1⁺, regroupées entre elles, des cellules SAMHD1^{low}. Un gène était considéré comme différentiellement exprimé entre les cellules SAMHD1^{low} et SAMHD1⁺ si (1) la différence évaluée par t-test est statistiquement significative ($p \leq 0.05$) et (2) si le facteur d'expression différentielle (fold change, FC) est ≥ 2 . Ces conditions ont été fixées par la plateforme de génomique.

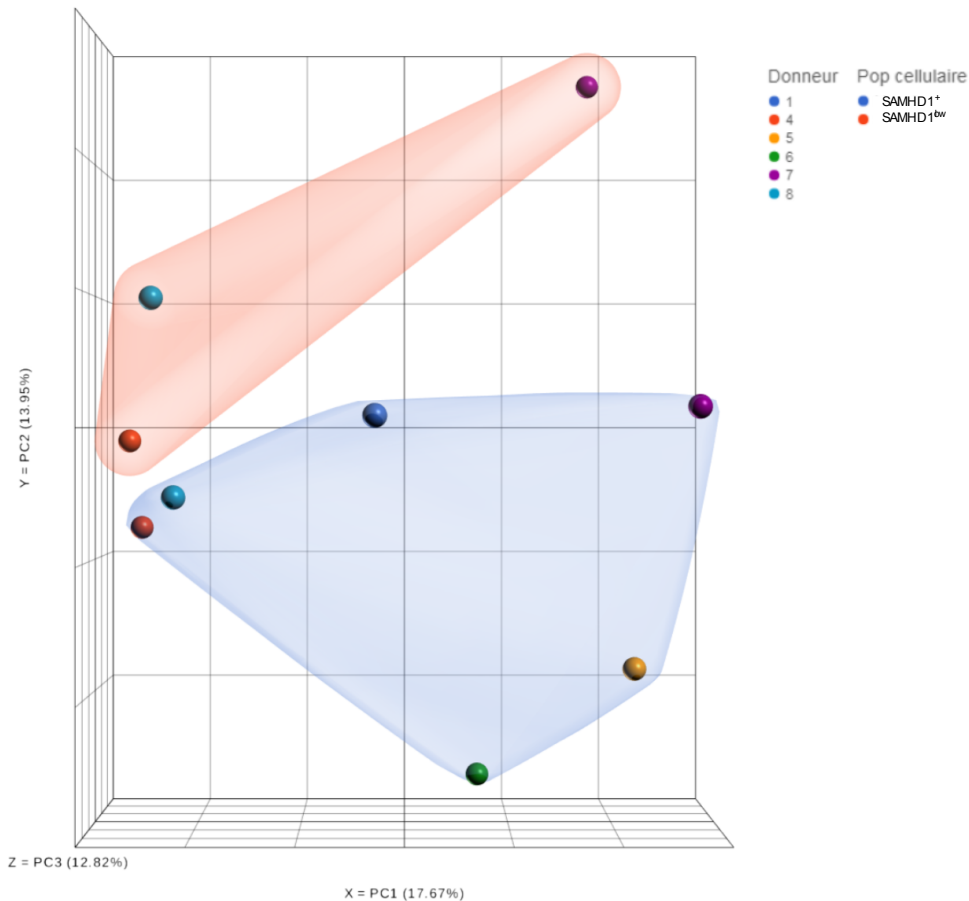


Figure 10. Représentation PCA de l'analyse des échantillons de cellules SAMHD1^{low} et SAMHD1⁺.

La comparaison des profils d'expression génique (PEG) des cellules SAMHD1^{low} et SAMHD1⁺ a mis en évidence trois cent quarante quatre (344) transcrits différenciellement exprimés, correspondant à 320 gènes, parmi lesquels 83 gènes sont sur-exprimés contre 237 gènes sous-exprimés au niveau des cellules SAMHD1^{low}. Le tableau A représente le top 40 des gènes sur-exprimés et sous-exprimés dans les cellules SAMHD1^{low} vs SAMHD1⁺. Nombre de ces gènes codent pour des enzymes (GTPase, désaminase, phosphatase), des régulateurs de transcription ou des protéines de liaison (Tableau. 1). Les gènes les plus différenciellement exprimés sont ZNF483 (facteur de transcription), RSRP1 (protéine de liaison) et SACM1L (phosphatase), surexprimés de 3.6, 3.4 et 3.3 fois, et KANSL1 (rôle dans l'acétylation des histones), NFRKB (régulateur de transcription) et RHBDF2 (rôle dans la régulation de la prolifération, la survie cellulaire et la migration) sous-exprimés de 6.5, 8.9 et 11.1 fois respectivement, dans les cellules SAMHD1^{low} en comparaison aux cellules SAMHD1⁺ (Tableau. 1).

Symbol du gène	Nom du gène	Fonction	FC
ZNF483	zinc finger protein 483	régulateur transcriptionnel	3.6
RSRP1	arginine and serine rich protein 1	Protéine de liaison	3.4
SACM1L	SAC1 like phosphatidylinositide phosphatase	Phosphatase, adhésion cellule-cellule, protéine de liaison	3.3
ANKRD36B	ankyrin repeat domain 36B	Protéine de liaison	3
TOMM5	translocase of outer mitochondrial membrane 5 protein transporter activity	Activité de transport des protéines	2.9
ZMIZ2	zinc finger MIZ-type containing 2	régulateur transcriptionnel	2.9
RBMS1	RNA binding motif single stranded interacting protein 1	Protéine de liaison, motif de reconnaissance d'ARN	2.8
FAM102A	family with sequence similarity 102 member A	Protéine de liaison	2.6
AMPD2	adenosine monophosphate deaminase 2	Désaminase, protéine de liaison	2.5
SH3BP2	SH3 domain binding protein 2	Protéine de liaison	2.5
RACK1	receptor for activated C kinase 1	Phosphatase, activateur de caspase, liaison cycline, liaison protéine kinase C	2.4
GIT2	GIT ArfGAP 2	Binding protein	2.4
GPCPD1	glycerophosphocholine phosphodiesterase 1	Enzym glycerophosphocholine phosphodiesterase	2.3
PLEKHA1	pleckstrin homology domain containing A1	Protéine de liaison	2.2
SLC38A5	solute carrier family 38 member 5	Transporteur d'acides aminés	2.2
ABHD3	abhydrolase domain containing 3	Enzyme, phospholipase A1, phospholipase A2	2.1
CD47	CD47	Récepteur transmembranaire	-2
GPI	glucose-6-phosphate isomerase	Glucose-6-phosphate isomerase	-2.7
RPTOR	regulatory associated protein of MTOR complex	Activateur de protéine kinase, Protéine de liaison à l'ADN	-2.7
HMG20B	high mobility group 20B	Régulateur de transcription	-2.8
CEP76	centrosomal protein 76	Régulation du cycle, protéine de liaison	-3
PRKAR1A	protein kinase cAMP-dependent type I regulatory subunit alpha	Inhibiteur de protéine kinase	-3.1
RAB40C	RAB40C, member RAS oncogene family enzyme, GDP binding, GTP binding	enzyme RAS oncogène, protéine de liaison GTP.	-3.2
FLAD1	flavin adenine dinucleotide synthetase 1	Adenylyltransferase, protéine de liaison	-3.3
TESPA1	thymocyte expressed, positive selection associated 1	Prolifération, différenciation et activation.	-3.3
LTBP3	latent transforming growth factor beta binding protein 3	Liaison TGFbeta	-3.6
CACTIN	cactin, spliceosome C complex subunit protein binding	activation NFkB, expression IFN Beta, production CXCL8, phosphorylation	-3.8
ZNF266	zinc finger protein 266	Régulateur de transcription	-4.2
AGAP1	ArfGAP with GTPase domain, ankyrin repeat and PH domain 1	GTPase	-4.2
CDC42SE1	CDC42 small effector 1	Inhibiteur de GTPase	-4.6
sept-02	septin 2	Inhibiteur de GTPase, protéine de liaison	-4.6
PSMD6	proteasome 26S subunit	necroptosis, apoptosis, degranulation, infection par VIH-1	-4.7
MARS	methionyl-tRNA	Synthétase, transcription d'ADN	-4.8
TRRAP	transformation/transcription domain associated protein	Régulateur de transcription	-4.9
TRAPPC3	trafficking protein particle complex 3	Protéine de liaison	-5.5
GM2A	GM2 ganglioside activator regulates	Enzyme ganglioside	-5.6
RAB2A	RAB2A, member RAS oncogene family alpha helix	GTPase, protéine de liaison	-5.8
KANSL1	KAT8 regulatory NSL complex subunit 1	Protéine de liaison	-6.5
NFRKB	nuclear factor related to kappaB binding protein	Régulateur de transcription	-8.9
RHBDP2	rhomboid 5 homolog 2	Protéine de liaison	-11.1

Tableau 1. Top 40 des gènes sur-exprimés et sous-exprimés dans les cellules mémoires SAMHD1^{low} comparées aux cellules mémoires SAMHD1⁺.

Parmi les 320 gènes différenciellement exprimés, 32 gènes ont une expression protéique membranaire, 7 d'entre eux sont des récepteurs transmembranaire tels que le CD47 (rôle dans l'adhésion et la prolifération, co-stimule l'activation des LT), IGF1R (CD221, tyrosine kinase impliqué dans le contrôle de la croissance cellulaire et de la survie) et ITGB1 (CD29, intégrine, interagit avec Tat du VIH-1) tous sous-exprimés 2.0, 2.27 et 1.6 fois dans les cellules SAMHD1^{low} vs SAMHD1⁺ (Tableau. 2).

Symbol du gène	Nom du gène	Type	FC
ABCA2	ATP binding cassette subfamily A member 2	transporter	-1.719
AP3B1	adaptor related protein complex 3 subunit beta 1	transporter	-1.542
SLC38A1	solute carrier family 38 member 1	transporter	-1.579
SLC38A5	solute carrier family 38 member 5	transporter	2.210
TM9SF2	transmembrane 9 superfamily member 2	transporter	-1.796
AGER	advanced glycosylation end-product specific receptor	transmembrane receptor	-1.958
CD47	CD47 molecule	transmembrane receptor	-2.079
FCGRT	Fc fragment of IgG receptor and transporter	transmembrane receptor	-1.772
IGF1R	insulin like growth factor 1 receptor	transmembrane receptor	-2.277
ITGB1	integrin subunit beta 1	transmembrane receptor	-1.624
JMJD6	arginine demethylase and lysine hydroxylase	transmembrane receptor	-1.723
RELT	RELT, TNF receptor	transmembrane receptor	-1.878
ADAM19	ADAM metalloproteinase domain 19	peptidase	-1.599
TRABD2A	TraB domain containing 2A	peptidase	-1.591
AKAP2	A-kinase anchoring protein 2	other	-1.757
CDC42SE1	CDC42 small effector 1	other	-4.574
JAML	junction adhesion molecule like	other	-1.654
PATJ	PATJ, crumbs cell polarity complex component	other	-1.557
PNN	pinin, desmosome associated protein	other	-2.316
RELL1	RELT like 1	other	-1.807
RGMB	repulsive guidance molecule BMP co-receptor b	other	-1.985
STOM	stomatin	other	1.529
TNS2	tensin 2	other	-1.863
WASH3P	WAS protein family homolog 3, pseudogene	other	-1.717
FYN	FYN proto-oncogene, Src family tyrosine kinase	kinase	-1.755
SSTR3	somatostatin receptor 3	G-protein coupled receptor	-2.113
ABHD3	abhydrolase domain containing 3	enzyme	2.147
GDPD5	glycerophosphodiester phosphodiesterase domain containing 5	enzyme	-1.572
GNG2	G protein subunit gamma 2	enzyme	-1.653
RAB40C	RAB40C, member RAS oncogene family	enzyme	-3.254
TBC1D10B	TBC1 domain family member 10B	enzyme	-1.580
VCL	vinculin	enzyme	-1.641

Tableau 2. Liste des gènes différentiellement exprimés dont l'expression protéique est membranaire sur les cellules SAMHD1^{low}.

L'analyse des voies canoniques où sont impliqués ces 320 gènes a mis en évidence 34 voies, représentées sur la Figure supplémentaire. 5. Les couleurs des histogrammes indiquent le sens probable d'implication de chaque voie (*Z*-score positif en orange= activation, *Z*-score négatif en bleu= inhibition de la voie, *Z*-score nul en blanc et *Z*-score indéterminé en gris) (**Figure supplémentaire. 4**). Nous avons représenté les principales voies canoniques (*Z*-score positif ou négatif) sur la figure 10. On peut y voir que les gènes les plus différentiellement exprimés entre les deux populations cellulaires sont impliqués dans la voie de signalisation par la famille Rho de GTPase (RACK1, RHOB, RHOT2), régulatrice de nombreux aspects de la

dynamique intracellulaire de l'actine (développement des organites, la dynamique du cytosquelette, le mouvement des cellules et d'autres fonctions cellulaires courantes), la voie mTOR (RPTOR, RICTOR, RHOB), régulatrice du métabolisme cellulaire, de la croissance et de la prolifération, phospholipase C (RACK1, ITGB1), protéine kinase A (RACK1, PLD6) et Tec kinase (ITGB1, RHOB), développement et maintien du système hématopoïétique, toutes décrites dans un sens d'inhibition. Dans l'ensemble, seulement deux voies canoniques ont été décrites dans un sens d'activation, il s'agit des voies de Sumoylation (ZNF217, NR3C1): capable de modifier la stabilité, la régulation des gènes, la localisation et les interactions protéine-protéine, joue également un rôle clé dans des processus cellulaires vitaux tels que l'oncogenèse, le contrôle du cycle cellulaire, le trafic nucléocytoplasmique, l'apoptose et la réponse à l'infection virale. La seconde voie canonique est la voie de signalisation RhoGDI (ARHGAP12, RACK1) régulatrice d'une multitude de processus biologiques, notamment la prolifération cellulaire, l'apoptose, la différenciation, la migration, la réorganisation du cytosquelette et le trafic membranaire. (Figure. 11). Le ratio indiquant le nombre de gènes différentiellement exprimés, rapporté au nombre total de gènes de la voie considérée, révèle que ces voies sont très faiblement représentées (de 3.1% à 6.2%).

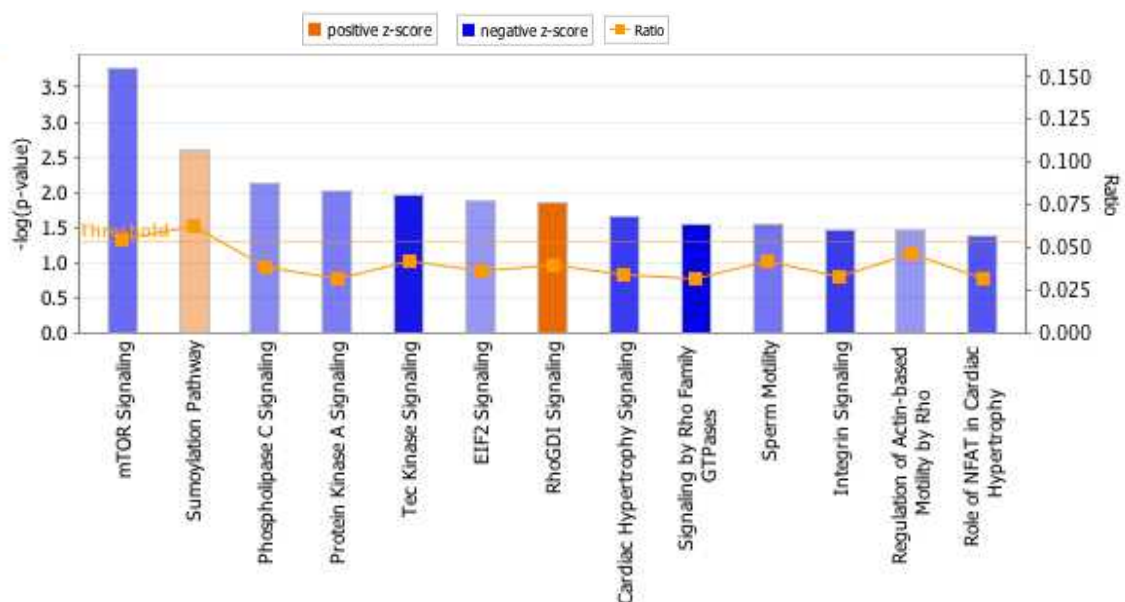


Figure 11. Voies canoniques impliquées dans l'analyse différentielle des PEG de cellules SAMHD1^{low} et SAMHD1⁺. Voies listées par degré décroissant de significativité, axe des ordonnées. Ratio indiquant le nombre de gènes différentiellement exprimés rapporté au nombre total de gènes de la voie considérée. Les couleurs des histogrammes indiquent le sens probable d'implication de chaque voie (Z-score positif en orange, activation ; Z-score négatif en bleu, inhibition de la voie).

De manière intéressante, l'analyse fonctionnelle des PEG a mis en évidence 24 gènes impliqués dans la voie de progression du cycle cellulaire (SACM1L, PNN) décrite dans un sens d'activation (Z -score= 1.39). Les 10 gènes les plus différenciellement exprimés dans cette voie sont représentés sur la figure (Figure. 12).

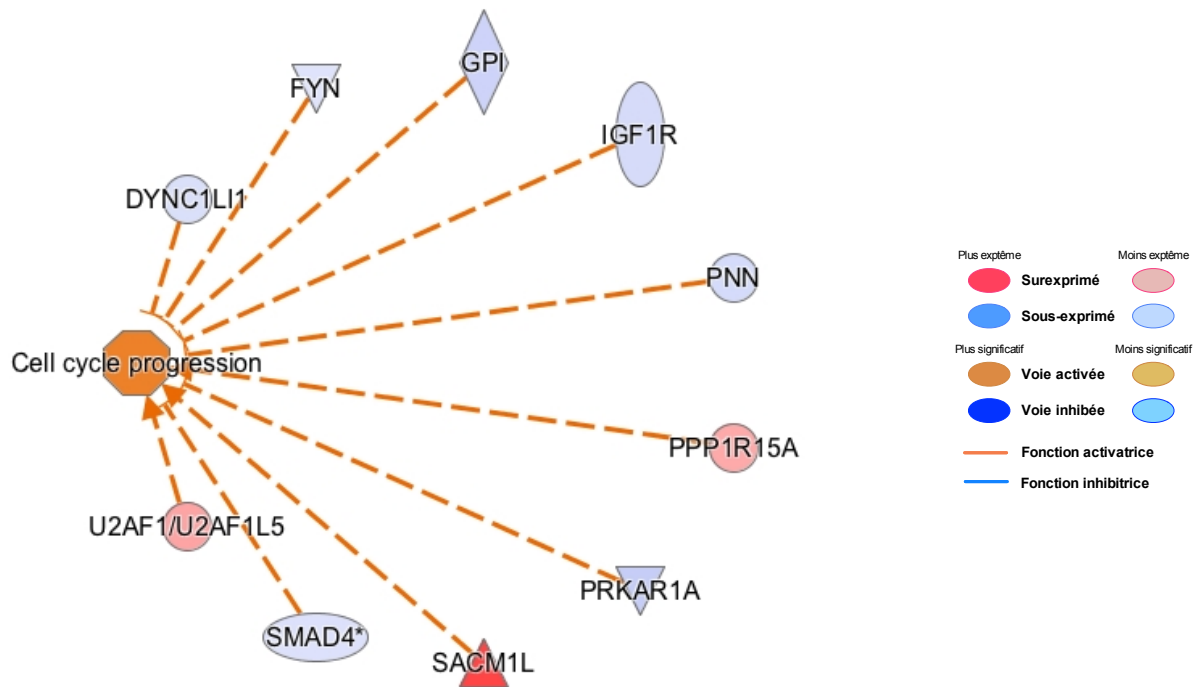


Figure 12. Gènes impliqués dans la voie de progression du cycle cellulaire, activée dans les cellules mémoires SAMHD1^{low}.

De plus, les PEG ont révélé 65 gènes impliqués dans les voies de mort cellulaire, la nécrose et l'apoptose, toutes décrites dans un sens d'activation, cependant, à des Z -scores relativement faibles (Z -score= 0.42, 0.39 et 0.51, respectivement). Les 31 gènes les plus différenciellement exprimés dans ces voies sont représentés sur la figure 13 (Figure. 13)

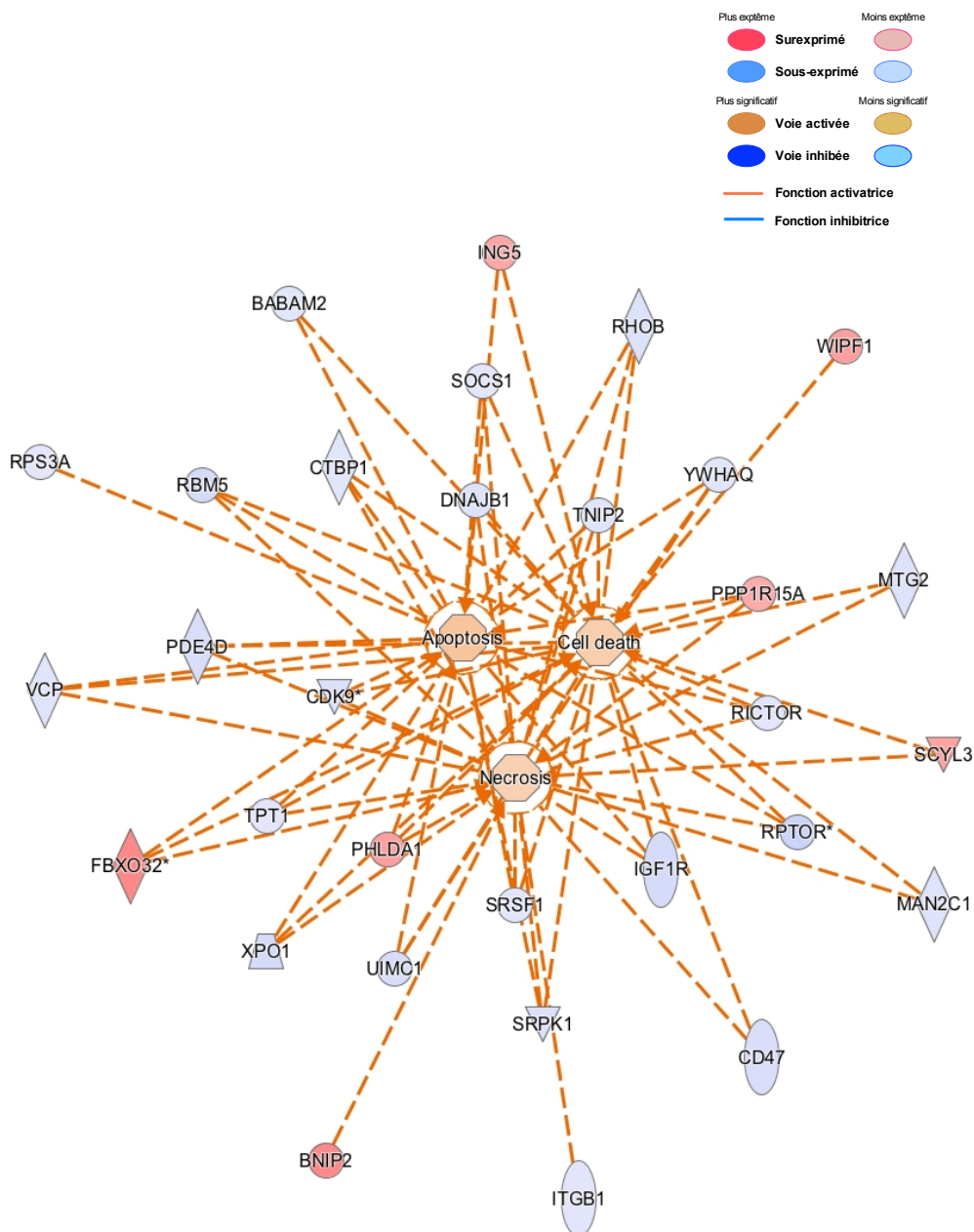


Figure 13. Gènes impliqués dans les voies de mort cellulaire, apoptose et nécrose, activées dans les cellules mémoires SAMHD1^{low}.

Pour finir, nous avons observé une inhibition considérable des voies de l'infection virale de façon générale (Z -score= -3.3), de l'infection par les virus à ARN (Z -score= -2.8) et par le VIH-1 de façon particulière (Z -score= -2.7), et de la voie de liaison aux rétrovirus (Z -score= -1.09). Nous avons révélé une liste de 52 gènes, dont 34 gènes les plus différenciellement exprimés sont représentés sur la figure 13 (Figure. 14).

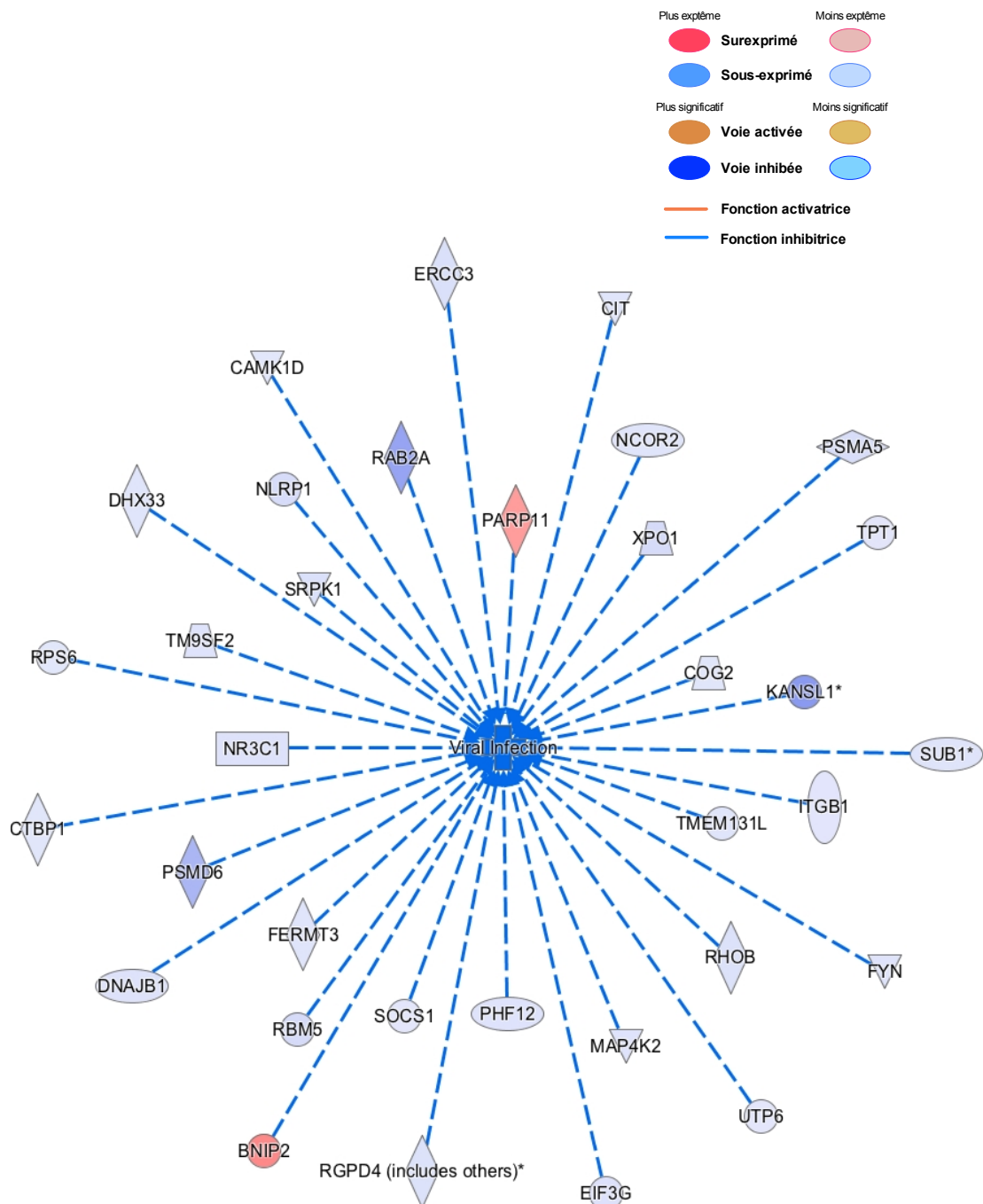


Figure 14. Gènes impliqués dans la voie de l'infection virale, inhibée dans les cellules mémoires SAMHD1^{low}.

Les Figures 15, 16 et 17 (heatmap) résument les niveaux relatifs d'expression des gènes les plus différenciellement exprimés et impliqués dans les voies du cycle cellulaire, de la mort cellulaire et de l'infection virale. On y voit clairement une surexpression des gènes du cycle cellulaire et de la mort cellulaire (en vert) et une surexpression des gènes de l'inhibition de l'infection virale (en vert) sur la partie droite des heatmaps (SAMHD1^{low}) en comparaison à la

partie gauche (SAMHD1⁺) (Figures. 15, 16 et 17). Notons que dans la voie « mort cellulaire », la population SAMHD1^{low} du donneur 7 se range, plutôt, du côté des populations SAMHD1⁺.

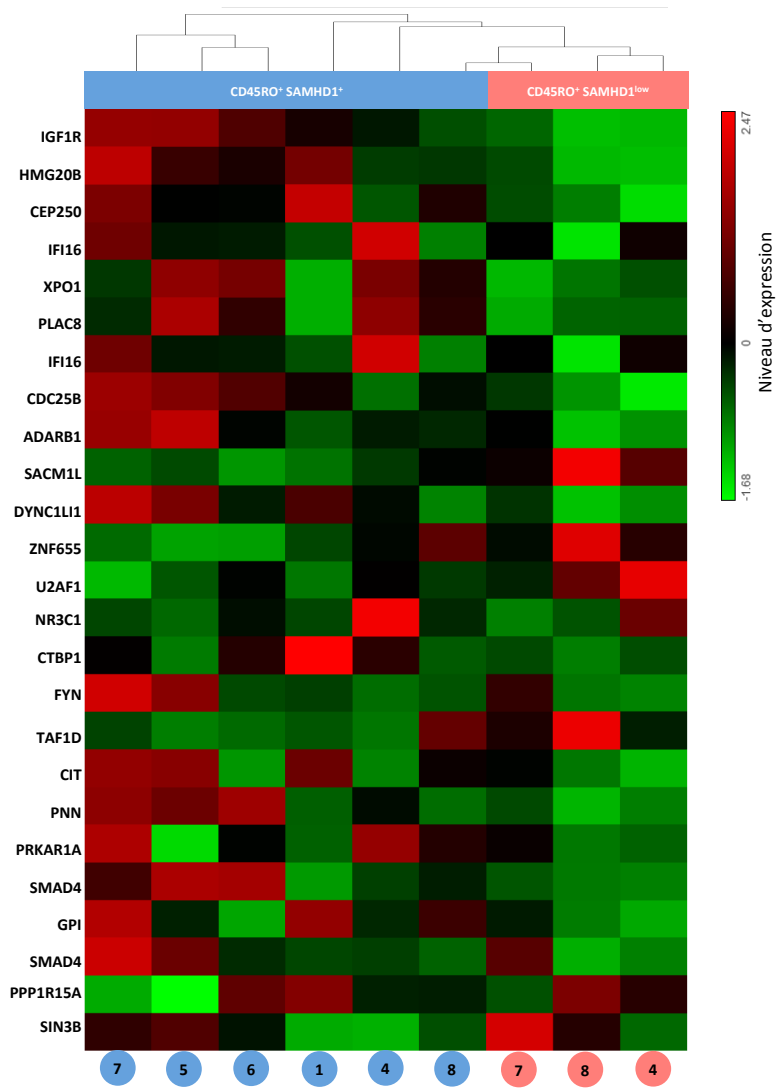


Figure 15. Heatmap représentant l'expression des gènes impliqués dans la voie de progression du cycle cellulaire à partir des transcrits différentiellement exprimés entre les cellules mémoires SAMHD1^{low} et SAMHD1⁺.

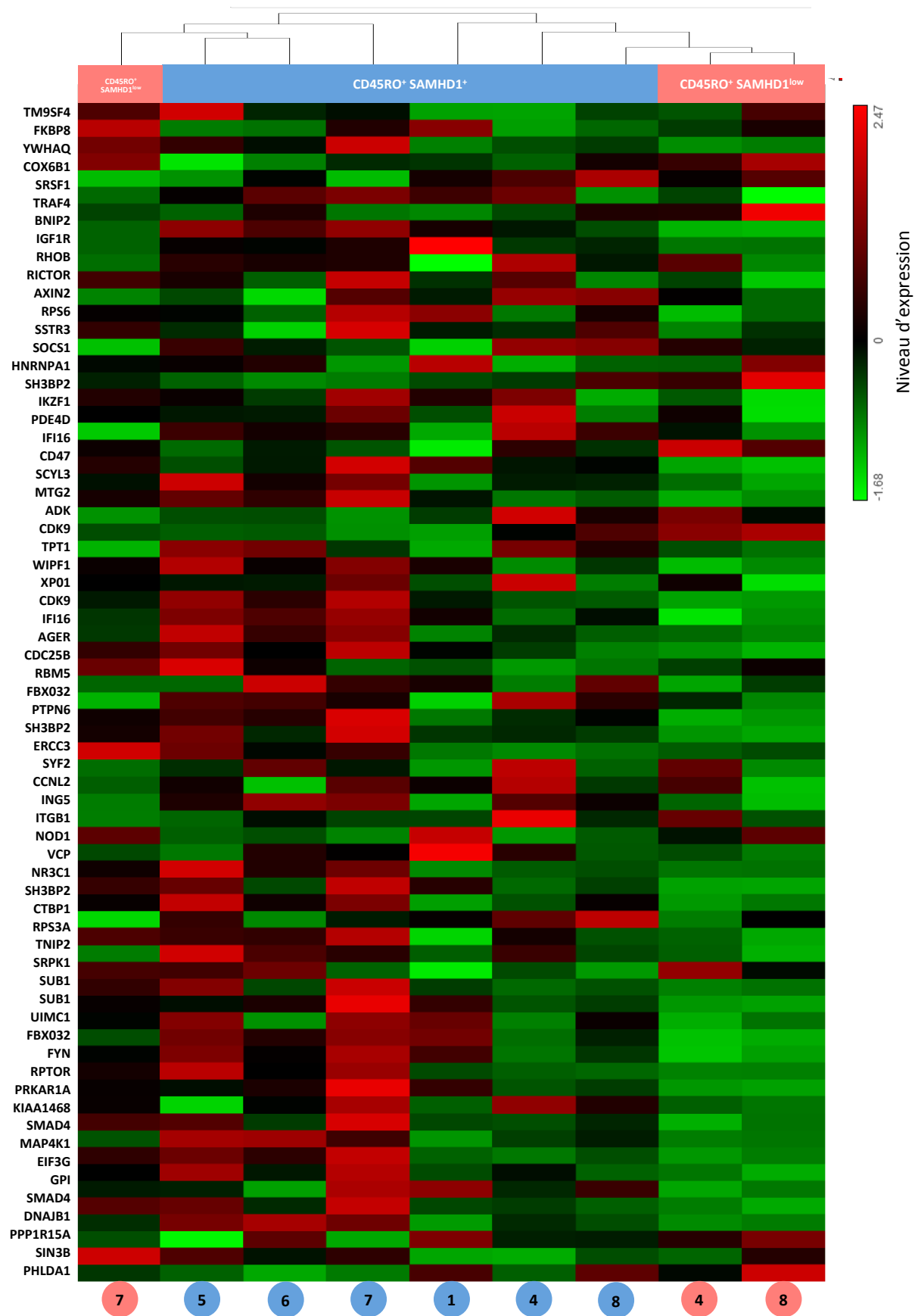


Figure 16. Heatmap représentant l'expression des gènes impliqués dans la voie de la mort cellulaire à partir des transcrits différentiellement exprimés entre les cellules mémoires SAMHD1^{low} et SAMHD1⁺.

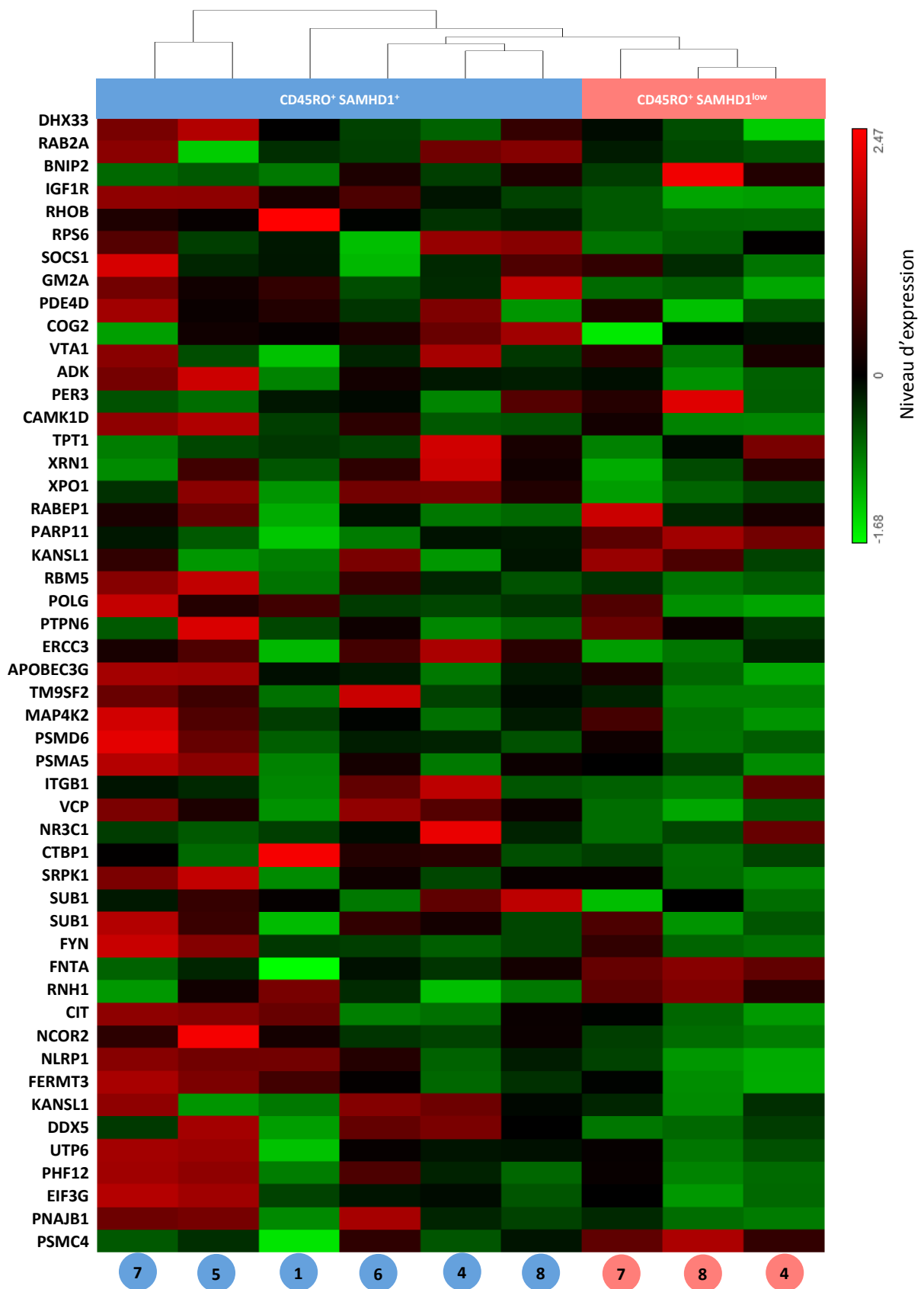


Figure 17. Heatmap représentant l'expression des gènes impliqués dans la voie de l'infection virale à partir des transcrits différentiellement exprimés entre les cellules mémoires SAMHD1^{low} et SAMHD1⁺.

ARTICLE :

Proliferative memory SAMHD1^{low} CD4⁺ T cells harbor high levels of HIV-1 DNA with compartmentalized HIV-1 populations. *PLoS Pathogens*, 2018 (soumis)

Proliferative memory SAMHD1^{low} CD4⁺ T cells harbor high levels of HIV-1 DNA with compartmentalized HIV-1 populations

Lylia Hani ^{1, 2, 3}, Antoine Chaillon ⁴, Marie-Laure Nere ⁵, Nicolas Ruffin ^{1, 2, 3}, Maud Salmona ⁵, Davey M. Smith ⁴, Jean-Daniel Lelièvre ^{1, 2, 3, 6}, Constance Delaugerre ⁵, Yves Lévy ^{1, 2, 3, 6} and Nabila Seddiki ^{1, 2, 3}

¹Inserm, U955, Equipe 16, Créteil, 94000, France.

²Université Paris Est, Faculté de médecine, Créteil, 94000, France.

³Vaccine Research Institute (VRI), Créteil, 94000, France.

⁴Department of Medicine, University of California San Diego, CA, USA

⁵Hôpital Saint Louis, INSERM U944, Université Paris Diderot, Paris, France France.

⁶AP-HP, Hôpital H. Mondor - A. Chenevier, Service d'immunologie clinique et maladies infectieuses, Créteil, 94000, France.

Key words: HIV-1, SAMHD1, memory T cell, Th17, Ki67

Words count:

Correspondence should be addressed to Dr. Nabila Seddiki

Hôpital Henri Mondor

Unité INSERM U955 Equipe 16/VRI

Bâtiment Recherche 1er étage, porte AA-072

51, Ave du Maréchal de Lattre de Tassigny

94010 Créteil

Tel : +33 1 49 81 39 02 ; Fax : +33 1 49 81 37 09

(nabila.seddiki@inserm.fr)

ABSTRACT

We have recently reported the presence of memory CD4⁺ T cells that express low levels of SAMHD1 (SAMHD1^{low}) in peripheral blood and lymph nodes from infected and uninfected HIV-1 individuals. These cells were enriched in Th17 and Tfh and were highly susceptible to HIV-1 infection. Here we investigated whether SAMHD1^{low} cells contain high levels of HIV-1 DNA with distinct sequence populations that distinguish them from other cells.

We used sorted memory CD4⁺ CD45RO⁺SAMHD1^{low}, CD45RO⁺SAMHD1⁺ and naïve CD45RO⁻SAMHD1⁺ cells from HIV-1 infected patients on anti-retroviral therapy (c-ART) to perform cell-associated HIV-1 DNA quantification, ultra-deep-sequencing of partial *env* (C2/V3) HIV-1 DNA and further phenotypic characterization of these subsets.

We show that in addition to Th17, SAMHD1^{low} cells include novel CCR6⁺ subsets that lack CXCR3 and CCR4, i.e CCR6⁺DN cells expressing a unique transcriptional signature of early Th17 (Wacleche, Goulet et al. 2016). Moreover, we observed that memory SAMHD1^{low} cells from c-ART patients harboured high levels of HIV-1 DNA compared to memory SAMHD1⁺ cells (4.5 [3.1-6.2] vs 3.8 [2.9-5.7] log/10⁶ cells, respectively, p=0.009), while naïve SAMHD1⁺ showed significantly lower levels (3.1 [1.6-4.4], p<0.0001 and p=0.006 vs SAMHD1^{low} and SAMHD1⁺ respectively). Importantly, phylogenetic analyses revealed well-segregated HIV-1 DNA populations with significant compartmentalization between SAMHD1^{low} and SAMHD1⁺ cells, and limited viral exchange. Furthermore, we confirmed that %Ki67⁺ cells were significantly higher in memory SAMHD1^{low} cells compared to memory SAMHD1⁺ (15.2% [8.56-56.8] vs 3.37% [1.76-8.81] respectively, p<0.0001) and importantly found that, while there was no correlation between HIV-1 DNA and Ki67 expression in memory SAMHD1⁺ and naïve SAMHD1⁺ CD4⁺ T-cells (r= +0.05 and r= +0.04 respectively, p>0.05), there was a statistically significant positive association between levels of HIV-1 DNA and Ki67⁺ in memory SAMHD1^{low} cells (r= +0.68, p<0.05). Altogether these data demonstrate that highly proliferative memory SAMHD1^{low} cells with well-segregated and compartmentalized HIV-1 DNA populations contribute to HIV-1 persistence.

INTRODUCTION

The remarkable stability of the latent HIV-1 reservoir in the CD4⁺ memory T cell population prevents viral eradication with current antiretroviral therapy (c-ART). HIV-1 persistence is established through two major mechanisms: constitution of a small pool of lifelong latently infected CD4⁺ T-cells early in infection, ensuring the persistence of the virus for decades during c-ART (Siliciano, Kajdas et al. 2003, Chomont, El-Far et al. 2009) and residual replication of the virus at low levels in anatomical reservoirs in which c-ART may not diffuse (Fletcher, Staskus et al. 2014). Identifying cellular markers expressed at the surface of these cells may lead to novel therapeutic strategies to eliminate, or at least reduce the size of the HIV-1 reservoir (International, Deeks et al. 2012).

HIV-1 populations can vary in resistance to drugs, diversity and cellular tropism (Si-Mohamed, Kazatchkine et al. 2000, Zhang, Rowe et al. 2002, Pillai, Pond et al. 2006). Viral compartmentalization between cellular subsets has been reported ((Fulcher, Hwangbo et al. 2004, Potter, Lemey et al. 2004, Delobel, Sandres-Saune et al. 2005), and the dynamics of HIV-1 migration between anatomical compartments has been largely investigated (Pillai, Good et al. 2005, Smith, Zarate et al. 2009, Butler, Delpont et al. 2010, Gianella, Mehta et al. 2012, Chaillon, Gianella et al. 2014). However, the compartmentalization of HIV-1 in the same pool of activated or memory CD4⁺ T cells within the same infected individual has not been investigated.

HIV-1 can persist in several subsets of CD4⁺ with different functional properties and trafficking potential (Chomont, El-Far et al. 2009, Gosselin, Monteiro et al. 2010, Monteiro, Gosselin et al. 2011, Buzon, Sun et al. 2014, Jaafoura, de Goer de Herve et al. 2014, Wacleche, Goulet et al. 2016). Central memory (T_{CM}) and transitional memory (T_{TM}) CD4⁺ T cells were identified as the major cellular reservoirs for HIV-1 during c-ART (Chomont, El-Far et al. 2009). A less differentiated subset of long-lived cells with high self-renewal capacity, the stem-cell memory CD4⁺ T cells (T_{SCM}), has been identified as a main contributor to long-term HIV-1 persistence (Buzon, Sun et al. 2014, Jaafoura, de Goer de Herve et al. 2014). Moreover, T follicular helper (T_{fh}) cells present in secondary lymphoid organs represent a target for HIV-1 infection and a major reservoir during c-ART (Perreau, Savoye et al. 2013, Banga, Procopio et al. 2016). T

regulatory (Tregs), Th17, Th1/Th17 CD4⁺ T cells, in addition to cells co-expressing CCR6 and CXCR3, show increasing contribution to the viral reservoir during c-ART (Andersson, Boasso et al. 2005, Gosselin, Monteiro et al. 2010, Sun, Kim et al. 2015, Khoury, Anderson et al. 2016). Recently, Wacleche et al. identified two novel Th17-polarized subsets, lacking (double negative, CCR6⁺DN) or co-expressing CXCR3 and CCR4 (double positive, CCR6⁺DP) that support a major contribution of HIV-1 persistence during c-ART (Wacleche, Goulet et al. 2016). Further evidence focusing on elucidating the mechanism(s) of viral dynamics and persistence in cellular subsets are still needed.

SAMHD1, a dNTP triphosphohydrolase, restricts productive HIV-1 infection in dendritic cells, myeloid cells (Hrecka, Hao et al. 2011, Laguette, Sobhian et al. 2011) and resting CD4⁺ T cells (Baldauf, Pan et al. 2012, Descours, Cribier et al. 2012). SAMHD1, through its deoxynucleoside triphosphates (dNTPs) hydrolase function, controls the intracellular dNTP pool (Baldauf, Pan et al. 2012, Descours, Cribier et al. 2012, Lahouassa, Daddacha et al. 2012). The restriction of HIV-1 infection by SAMHD1 occurs via its ribonuclease activity and phosphorylation of SAMHD1 inhibits this restrictive function (Cribier, Descours et al. 2013, Welbourn, Dutta et al. 2013, White, Brandariz-Nunez et al. 2013).

Recently, we reported that circulating memory CD4⁺ T cells comprise a population of cells expressing low levels of SAMHD1 (Ruffin, Brezar et al. 2015). Those memory SAMHD1^{low} CD4⁺ T cells were highly differentiated and activated (CD38⁺, PD-1⁺, HLA-DR⁺), exhibited a large proportion of cycling cells and were enriched in Th17 in peripheral blood. We also demonstrated that SAMHD1^{low} cells were more susceptible to HIV-1 infection and thus preferentially depleted in HIV-1 infected individuals. In secondary lymphoid organs, Tfh cells from infected patients lacked the expression of SAMHD1, which was accompanied by a higher susceptibility to HIV-1 infection *in vitro* (Ruffin, Brezar et al. 2015).

In the present study, we investigated whether memory SAMHD1^{low} cells that hold high proliferative capacity, contain increased levels of HIV-1 DNA with distinct HIV-1 populations, viral compartmentalization and migration events between CD4⁺ T cell subsets. We used sorted memory CD45RO⁺SAMHD1^{low}, CD45RO⁺SAMHD1⁺ and naïve CD45RO⁻SAMHD1⁺ cells from c-ART HIV-1 infected patients.

METHODS

Biological samples

Peripheral blood was collected from healthy controls (n=13) obtained from Etablissement Français du Sang (Créteil, France) and from c-ART HIV-1 infected individuals (n=49), were recruited at the Department of Infectious Diseases in Henri Mondor Hospital (Créteil, France). Patients from this cohort were used for phenotypic characterization and/or HIV-1 DNA quantification and sequencing. HIV-1 infected elite controllers (EC, n=6) were included in some experiments. Table 1 summarizes patients' characteristics; for HIV-1 treated patients, [median (range) CD4⁺ T-cell count: 572 (129–1393) cells/ml; HIV-1 RNA: <20 (0–7404) copies/ml]; for EC (CD4⁺ count: 900 cells/μl).

***ex-vivo* T-cell phenotyping**

Fresh PBMCs were isolated by density gradient centrifugation. FACS staining was carried out in PBS 1X supplemented with 2% FBS (foetal bovine serum) for 30 min at 4°C using the following fluorochrome-conjugated antibodies: APC-Vio770 anti-CD4, PerCP-Cy5.5 anti-CD3 (Milteniy Biotech, Paris, France), PE-CF594 anti-CD45RO, Alexa-Fluor 647 anti-CCR4, PE anti-CXCR3, PE-Cy7 anti-CCR6 (Becton Dickinson Biosciences, Pont de Claix, France). Intracellular staining was carried out using the FoxP3 permeabilization solution kit according to the manufacturer's instructions (eBioscience, Paris, France) together with Alexa-Fluor 488 anti-SAMHD1 (from O. Schwartz's lab; Institut Pasteur, Paris). Dead cells were excluded using the Live/Death Vivid detection kit labeled with an aqua dye (Invitrogen). Fluorescence intensities were measured with an LSR II flow cytometer (Becton Dickinson) and analyzed using FlowJo version 10.0.7 (Tree Star Inc., Ashland, Oregon, USA).

Cell sorting

Fresh peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated by density gradient centrifugation. CD4⁺ T-cells were separated from PBMCs using the "CD4 T cell Isolation kit II" (Miltenyi Biotech) according to the manufacturer's instructions.

Staining was performed on fresh samples, directly following PBMCs collection and CD4⁺ T-cells isolation. Cells were stained with a cocktail of fluorochrome-conjugated antibodies for 30 min at 4°C: APC-Vio770 anti-CD4 (Miltenyi Biotech), Pacific Blue anti-

CD3 and PE-CF594 anti-CD45RO (BD Bioscience). Following surface staining, cells were washed once in PBS 1X/ 2% FBS and fixed/permeabilized using the “FoxP3 permeabilization solution kit” according to the manufacturer’s instructions (Affymetrix, eBioscience). Intracellular staining was performed using Alexa-Fluor 488 anti-SAMHD1 and cells were immediately sorted according to CD45RO and SAMHD-1 expression, using a MoFlo Astrios (Beckman coulter).

Decross-link and DNA extraction

HIV-1 DNA was purified in column extraction, using the QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen) and additional decross-link step. Sorted cells were washed and resuspended by pulse-vortex in 200 μ l PBS 1X, 200 μ l lysing buffer AL from the QIAamp DNA Blood Mini Kit supplemented with 20 μ l Proteinase K. After 10 min incubation at 56°C, 1.25 mM NaCl was added, and lysates were incubated for another 4 hours at 66°C. 40 μ l of Proteinase K was added and lysates were incubated for an additional 60 min at 45°C. Lysates were stored at -80°C or processed immediately.

All reagents used for subsequent DNA extraction were provided from the QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen). Following decross-linking steps, tubes were incubated at 100°C for 30 min, mixed by pulse-vortexing every 10 min and cooled at room temperature. Tubes were briefly centrifuged and complemented with 200 μ l ethanol (96-100%). Lysates were mixed, applied to the QIAamp Mini spin columns and centrifuged at 6000 x *g* for 3 min. The columns were placed in clean collection tubes after each centrifugation step. Columns were supplied with 600 μ l buffer AW1 and centrifuged at 6000 x *g* for 3 min. Another 600 μ l buffer AW2 was added and columns were centrifuged at 20,000 x *g* for 3 min, then centrifuged at full speed for 1 min respectively. DNA elution was performed by adding 100 μ l buffer AE preheated at 70°C to the columns. After 5 min incubation at room temperature, tubes were centrifuged at 6000 x *g* for 3 min. DNA Eluates of nucleic acid extract were stored at -80°C.

Unfixed cells were used for DNA extraction without decross-link step. 0.5x10⁶ PBMCs samples from each patient were kept for this purpose.

HIV-1 DNA quantification

Quantification of total HIV-1 DNA was performed using the commercial kit « Generic HIV DNA Cell » (Biocentric, Bandol, France) Viral DNA was quantified in PBMCs and sorted

cells by real-time PCR, by detecting and amplifying the LTR region of total cellular HIV-1 DNA, integrated or not. The quantification was carried out on 20 µl of nucleic acid extract, with a maximum of 150,000 cells, according to the manufacturer's protocol. It was calibrated by carrying out and quantifying HIV-1 DNA range of known concentrations (6 to 6000 copies / 20 µl of solution); this DNA was derived from the HIV-1 strain HXB2, produced by the 8E5 cell line. Total cell number of each sample was determined by the quantification of the albumin gene. The amount of HIV-1 DNA copies was expressed per million PBMCs.

Next Generation Sequencing and Sequence Analyses

Deep sequencing of PCR-amplified *env* C2-V3 (HXB2) was performed using the Roche 4.5.4 GS Junior platform (Basel, Switzerland) with microtiter-plate pyrosequencing technology. The different stages of this sequencing required the use of the GS Junior kit emPCR Kit Lib-A (Roche®), respecting the manufacturer's protocol. Read (FASTA) and quality score files produced by the 454 instruments were further analyzed using a bioinformatics pipeline available at <https://github.com/veg/HIV-NGS>. In brief, high-quality reads were retained and aligned to HXB2 as a reference sequence (without generation of contigs) using an iterative codon-based alignment procedure. Identical sequence reads were clustered, allowing identification of nonredundant sequences. When a cluster contained a minimum of ten identical sequence reads, a haplotype was inferred, and the proportion of reads in each haplotype was collected as previously described (Chaillon A, Gianella S. J Virol. 2018; Mehta SR, Wertheim JO, EBioMedicine. 2015 Oct). The final output consisted of a list of representative haplotypes and their relative frequencies. For each sample, we then computed the average pairwise distance (APD) between reads with at least 100 overlapping base pairs to quantify nucleotide diversity under the Tamura Nei 93 model (Tamura K, Nei M. *Molecular biology and evolution* 1993). We also quantified the APD (i.e. divergence) between HIV-1 populations originating from different cellular subsets within each host.

Phylogenetic analysis. HIV haplotypes above a minimal frequency threshold of 0.01 were extracted and were used to construct maximum likelihood phylogenies using FastTree (Price MN, Dehal PS, *Mol Biol Evol* 2009; Brodin J, Zanini F, *Elife* 2016).

Viral Compartmentalization

Evaluation of the population genetic structure (i.e. compartmentalization) was first assessed by the F_{ST} approach defined as $F_{ST} = 1 - \frac{\pi_I}{\pi_D}$, where π_I is the estimate of mean pairwise intra-compartment genetic distance (TN93) (Chen W, Wang H. *Mol Phylogenet Evol* 2015) and π_D is its inter-compartment counterpart (Hudson RR. *Genetics* 2000). Both quantities were computed by comparing all reads from all cellular subsets, subject to the requirement that they share a minimum 150 aligned nucleotide positions. Subsequently, to guard against inference of compartmentalization by skewing of allelic frequencies due to PCR amplification and other biases, we recomputed F_{ST} by discarding copy number counts for read clusters (i.e. each cluster was counted as having only one sequence), i.e. all haplotypes are assigned a relative weight of 1. Statistical significance of both tests was derived via 1,000 population-structure randomization/permutation test. We also performed a tree-based Slatkin-Maddison (SM) test for compartmentalization (Slatkin M, Maddison WP. *Genetics* 1989). This method determines the minimum number of migration events between compartments (i.e. cellular subset). Statistical support was determined by comparing this number of migration events to the number of events that would be expected in a randomly structured population (Zárata S, Pond SLK, *J Virol* 2007; Slatkin M, Maddison WP. *Genetics*,1989). HIV-1 sequenced populations were considered compartmentalized if all tests were congruent.

RESULTS

Memory CD4⁺SAMHD1^{low} cells are depleted in c-ART HIV-1 infected patients and are enriched in Th17-polarized CCR6⁺ populations

We have previously demonstrated that peripheral blood memory SAMHD1^{low} CD4⁺ T cells were enriched in CXCR3⁻CCR6⁺CCR4⁺ Th17 cells (Ruffin, Brezar et al. 2015). Here we sought to determine whether SAMHD1^{low} cells include novel CCR6⁺ subsets that lack CXCR3 and CCR4 (Wacleche, Goulet et al. 2016), namely double negative (DN) CCR6⁺ cells. These cells express a unique transcriptional signature of early Th17 and contain replication competent HIV-1, and double positive (DP) CCR6⁺ cells that co-express both molecules.

We first assessed the presence of total memory CD4⁺SAMHD1^{low} cells (gating strategy **Fig. 1a**) in peripheral blood of c-ART HIV-1 infected patients (n=17) then determined their frequencies and compared them to uninfected individuals (n=13). We found a significant decrease of %SAMHD1^{low} cells in patients as compared to uninfected controls (2.97% [1.27-9.75] vs 6.79% [1.83-12.5] respectively, P<0.001) (**Fig. 1b**). Moreover we examined the presence of SAMHD1^{low} cells in Th17, Th1Th17, CCR6⁺DN and CCR6⁺DP cell populations using similar gating strategies as previously reported (**Fig. 1c** and (Wacleche, Goulet et al. 2016)). We found a significant decrease of %SAMHD1^{low} cells amongst Th17, CCR6⁺DN and CCR6⁺DP populations in c-ART HIV-1⁺ patients as compared to uninfected controls (5.07% vs 15.3% P<0.001, 0.84% vs 1.93% P<0.05 and 5.12% vs 8.82% P<0.5, respectively) (**Fig. 1d**), while they were comparable in Th1Th17 compartment (1.68% vs 3.63%, p>0,05).

Next we assessed and compared the percentages of these 4 subsets in SAMHD1^{low} and SAMHD1⁺ compartments in both HIV-1 infected and uninfected groups. Consistently, we found a significant enrichment of Th17 cells in SAMHD1^{low} compartment as compared to Th1Th17, CCR6⁺DP and CCR6⁺DN in HIV-1⁺ patients (41% [17.5-62.5] vs 15.3% [3.7-35.5], 7.95% [1.18 -22.2] and 5.62% [1.75-17.5]) respectively, P<0.0001) (**Fig. 2a**). This trend was similar in uninfected individuals (55% [24.6-76.7] vs 11.8% [3.18-24.6], 8.58% [3.35-19.7] and 3.8% [1.67-8.8]) respectively, P<0.0001). Importantly, we observed a significant decrease of %Th17 in SAMHD1^{low} compartment in infected compared to uninfected individuals (41% [17.5-62.5] vs 55% [24.6-76.7], p<0.05), in

contrast to CCR6⁺DN cells that increased significantly (7.95% [1.18-22.2] vs 3.8% [1.67-8.8], $p < 0.05$) **Fig. 2b**). No significant differences were observed in the SAMHD1⁺ compartment for Th17 cells between infected and uninfected individuals (17.9% [6.71-35] vs 25.1% [9.5-47.2], $p > 0.05$), while CCR6⁺DN cells increased significantly (24.8% [10.8-35] vs 14.7% [6.38-28.4] $p < 0.05$) (**Fig. 2b**). These results point out that Th17 and CCR6⁺DN, two major populations that are susceptible to HIV-1 infection, are present in SAMHD1^{low} cells.

Memory CD4⁺CD45RO⁺SAMHD1^{low} cells exhibit the highest level of HIV-1 DNA.

Differential expression of CD45RO and SAMHD1 molecules identifies CD45RO⁺SAMHD1⁺, CD45RO⁺SAMHD1^{low} memory and CD45RO⁻SAMHD1⁺ naïve CD4⁺ T-cell subsets (Ruffin, Brezar et al. 2015). We reasoned that SAMHD1^{low} cells, that are enriched in Th17 and CCR6⁺DN cells would contain high levels of HIV-1 DNA.

In order to quantify HIV-1 DNA, CD45RO⁺ SAMHD1^{low} and SAMHD1⁺ memory and CD45RO⁻SAMHD1⁺ naïve cells were FACS-sorted based on their SAMHD1 expression (low or high) (**Fig. 3a**). Given that cells required fixation and permeabilization for staining, we developed suitable protocols for nucleic-acids extraction and quantitative PCR experiments for HIV-1 quantification as detailed in the methods part.

We first trialed our new protocol using unfixed and fixed/permeabilized peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) to quantify and compare levels of total HIV-1 DNA in 10 HIV-1 infected individuals receiving c-ART, with a limit of detection of 3 copies/PCR. We expressed each value as number of HIV-1 DNA copy per million of cells. The results indicated that fixed and unfixed PBMCs harboured HIV-1 DNA at equivalent levels (**Fig. 3b** left panel; median: 1524.07 [179-2947.2] vs 1159.48 [59.31-3487] copies/ 10^6 cells, respectively, $p = 0.6520$). Importantly, HIV-1 DNA copy numbers in fixed and unfixed PBMCs were significantly correlated, thus showing the reliability of our protocol ($r = 0.96$, $p < 0.0001$, **Fig. 3b** right panel). Moreover, we measured and compared HIV-1 DNA levels in CD4⁺CD45RO⁺ memory vs CD4⁺CD45RO⁻ naïve populations and as expected, we clearly observed that fixed memory CD4⁺ CD45RO⁺ exhibited higher levels of HIV-1 DNA as compared to fixed naïve CD4⁺ CD45RO⁻ T cells (median: 5312.43 [792.55-41939] vs 1168.65 [40-12149.21] copies/ 10^6 cells, respectively, $p = 0.0029$, **Fig. 3c**), demonstrating the suitability of established protocols to quantify HIV-1 DNA from sorted SAMHD1⁺ and SAMHD1^{low} CD4⁺ T-cells.

We next determined whether SAMHD1^{low} cells harboured highest HIV-1 DNA levels in comparison to SAMHD1⁺ from infected individuals under c-ART (n=30). By using the above described protocol, we observed that memory SAMHD1^{low} cells from c-ART HIV-1 infected individuals harboured high levels of HIV-1 DNA compared to memory SAMHD1⁺ cells (4.5 [3.1-6.2] vs 3.8 [2.9-5.7] log/10⁶ cells, respectively, p=0.009), while naïve SAMHD1⁺ showed significantly lower levels (3.1 [1.6-4.4], p<0.0001 and p=0.006 vs SAMHD1^{low} and SAMHD1⁺ respectively) (**Fig. 3d**). In HIV-1 infected elite controllers group (EC, n=6), both memory SAMHD1^{low} and SAMHD1⁺ cells harboured low levels of HIV-1 DNA as anticipated (1.6 and 2.3 log/10⁶ cells, respectively, p>0.05) (**Fig. 3e**). Noteworthy naïve SAMHD1⁺ cells from EC showed lower DNA compared to naïve SAMHD1⁺ cells from c-ART HIV-1 infected individuals (1.6 and 3.1 log/10⁶ cells, respectively, p=0.001) (**Fig. 3f**). Of note, there was no association between levels of HIV-1 DNA and patients' clinical characteristics (gender, age, duration under c-ART, nadir CD4). Altogether, these results identify memory SAMHD1^{low} CD4⁺ T cells as a novel cell subset harbouring high levels of HIV-1 DNA among memory cells, thus contributing to HIV-1 reservoir.

HIV-1 viral populations are differentially compartmentalized in memory SAMHD1^{low} and SAMHD1⁺ cells.

It is well known that HIV-1 infects and rapidly disseminates in CD4⁺ T cells representing thus a reservoir that will seed other cell compartments and tissues as soon as c-ART is stopped (Kulpa and Chomont 2015). We reasoned that HIV-1 sequences identification and comparison across memory SAMHD1^{low} and SAMHD1⁺ as well as naïve SAMHD1⁺ subsets, will provide important information on viral exchange and spread between CD4⁺ subsets.

To reach this goal, we performed ultra-deep-sequencing (UDS, 454/Roche) of partial HIV-1 *env* (C2/V3) DNA, obtained from sorted CD45RO⁺SAMHD1⁺ CD45RO⁺SAMHD1^{low} and naïve CD45RO⁻SAMHD1⁺ CD4⁺ T-cells of 12 HIV-1 infected individuals receiving c-ART. Phylogenetic analyses revealed well-segregated HIV-1 DNA populations between memory SAMHD1^{low} and SAMHD1⁺, and naïve SAMHD1⁺ CD4⁺ T-cells subsets (p<0.001) in all but 2 individuals (#11 & #12 individuals). Next, we applied non-parametric test for

population structure to all participants for each cellular subset. When assessing viral population structure across all subsets, FST and Slatkin Maddison approaches confirmed significant compartmentalization between SAMHD1^{low} and SAMHD1⁺ cells in 10 samples (**Fig. 4**) but 2 (#11 & #12 individuals). The remaining 2 individuals did not exhibit significant signals for compartmentalization represented by non-homogeneous distribution of the three populations (**Fig. 5**).

To quantify the diversity of HIV-1 *env* in HIV population originating from different subsets, we computed the APD between reads in all samples from the 12 studied individuals. We also determined the genetic divergence (i.e. APD between reads) from different cellular subsets within host.

Every individual showed distinct degrees of HIV-1 DNA diversity within subsets and divergence between subsets (see schematic **Supplementary figure 1**). The APD between subsets (i.e. divergence) confirmed the well-segregated HIV-1 DNA populations in subsets, suggesting a very limited viral exchange. We then used Slatkin Maddison counts to provide a quantitative estimate of viral gene flow between each cell subset. We confirmed the minimal viral exchange represented by low number of migration events originating from both memory SAMHD1^{low} and SAMHD1⁺ cells toward naïve SAMHD1⁺ and memory SAMHD1⁺ cell subsets, and naïve SAMHD1⁺ and memory SAMHD1^{low} cell subsets, respectively. Limited viral exchange originating from naïve SAMHD1⁺ was detected, predominantly directed toward memory SAMHD1⁺ cell subset.

HIV-1 DNA levels positively correlated with Ki67 expression in memory SAMHD1^{low} cells.

In our previous study we reported that peripheral SAMHD1^{low} CD4⁺ T-cells were enriched in cycling cells (Ruffin, Brezar et al. 2015). Here, we evaluated Ki67 expression in patients and assessed the relationship between Ki67 and HIV-1 DNA in memory SAMHD1^{low} and SAMHD1⁺ CD4⁺ cells.

We first investigated the expression of Ki67 in c-ART HIV-1 infected individuals. As expected and as previously shown (Ruffin, Brezar et al. 2015), we confirmed that %Ki67⁺ cells were significantly higher in memory SAMHD1^{low} cells compared to memory SAMHD1⁺ and naïve SAMHD1⁺ cells (15.2% [8.56-56.8] vs 3.37% [1.76-8.81] and 0.23%

[0-0.79] respectively, $p < 0.0001$) (**Fig. 6a and b**). We next assessed the relationship between Ki67 expression and levels of HIV-1 DNA in SAMHD1^{low} and SAMHD1⁺ memory and SAMHD1⁺ naïve cells. While there was no correlation between HIV-1 DNA and Ki67 expression in memory SAMHD1⁺ and naïve SAMHD1⁺ CD4⁺ T-cells (**Fig. 6c** top right and bottom panels, $r = +0.05$ and $r = +0.04$ respectively, $p > 0.05$), we observed a statistically significant positive association between levels of HIV-1 DNA and Ki67⁺ in memory SAMHD1^{low} cells ($r = +0.68$, $p < 0.05$) (**Fig. 6c**, left top panel).

Moreover, on few patients where both HIV-1 DNA levels and Th17, CCR6⁺DN and CCR6⁺DP cell frequencies were available, we sought to determine if viral DNA was associated to % of one of these subsets. We did not find any correlation between HIV-1 DNA and %Th17, %CCR6⁺DN nor %CCR6⁺DP cells (data not shown). Altogether, these results suggest that Ki67⁺SAMHD1^{low} cells represent a reservoir for HIV-1.

DISCUSSION

The goal of this study was to investigate whether the highly proliferative memory SAMHD1^{low} CD4⁺ T cells, previously identified by our group as being permissive to HIV-1 and significantly depleted during infection (Ruffin, Brezar et al. 2015), contribute to HIV-1 persistence. To this end we performed HIV-1 DNA quantification and sequencing in sorted CD4⁺ memory CD45RO⁺SAMHD1^{low}, CD45RO⁺SAMHD1⁺ cells and naïve CD45RO⁻SAMHD1⁺ cells from c-ART HIV-1 infected individuals and we characterized their phenotype. Our results demonstrate that (i) Th17 and CCR6⁺DN-expressing transcriptional signature of early Th17 (Wacleche, Goulet et al. 2016, Wacleche, Landay et al. 2017), two major populations that are susceptible to HIV-1 infection, are present in SAMHD1^{low} cells, and while the former decreased significantly in c-ART HIV-1 infected compared to uninfected individuals, the latter significantly increased; (ii) memory SAMHD1^{low} cells from c-ART patients carry high levels of HIV-1 DNA compared to SAMHD1⁺ cells, and these levels positively and significantly correlated with Ki67 expression; (iii) phylogenetic analyses revealed well-segregated HIV-1 DNA populations with significant compartmentalization between SAMHD1^{low} and SAMHD1⁺ cells and limited viral exchange. Altogether these data demonstrate that memory SAMHD1^{low} cells contribute to HIV-1 persistence.

It is well known that persistence of long-lived and latently infected resting memory cells in c-ART patients, represents the major barrier to cure (Chun, Finzi et al. 1995, Chun, Stuyver et al. 1997, Finzi, Hermankova et al. 1997, Wong, Hezareh et al. 1997, Finzi, Blankson et al. 1999, Siliciano, Kajdas et al. 2003, Crooks, Bateson et al. 2015). It has been suggested that the pool of latently infected cells is not static and HIV-1 reservoir can persist through cell proliferation, whether it is homeostatic- or TCR- induced (Chomont, El-Far et al. 2009, Soriano-Sarabia, Bateson et al. 2014, Boritz, Darko et al. 2016), but also through provirus integration into cellular genes associated with cell survival and/or proliferation (Maldarelli, Wu et al. 2014, Wagner, McLaughlin et al. 2014). Thus low-viral replication leads to de novo cellular infection and constant replenishment of HIV-1 reservoir.

Based on our recent data where we demonstrated that SAMHD1 levels decreased with cell proliferation, which was associated with higher susceptibility to HIV-1 infection *in*

in vitro ((Ruffin, Brezar et al. 2015), we reasoned that memory SAMHD1^{low} cells from c-ART infected patients harbor high levels of HIV-1 DNA that correlate with their proliferative capacity. Indeed we found that patients' memory SAMHD1^{low} cells harboured significant high levels of HIV-1 DNA as compared to memory SAMHD1⁺ cells and expressed increased Ki67 levels which confirms previous data obtained with a different cohort of c-ART infected patients (Ruffin, Brezar et al. 2015). Most importantly, we observed a statistically significant positive association between levels of HIV-1 DNA and Ki67 expression in memory SAMHD1^{low} cells ($r = +0.68$, $p < 0.05$), while there was no correlation between HIV-1 DNA and Ki67 expression in memory SAMHD1⁺, which strongly suggest that SAMHD1^{low} CD4⁺ contribute to HIV-1 persistence. Our data are in accordance with a recent report where it has been elegantly shown that HIV-1 targets host DNA in a cell-cycle dependent manner (Kane, Rebersburg et al. 2018).

Given that SAMHD1^{low} cells required fixation and permeabilization for cell sorting, we could not perform cell growth culture experiments to univocally demonstrate that HIV-1 from these cells is replication-competent. Indeed, future gene profiling analyses of sorted live cells should identify extracellular markers that will allow their isolation for functional studies.

We next used ultra-deep sequencing to genetically characterize HIV-1 DNA population from sorted memory SAMHD1^{low}, SAMHD1⁺ and naïve SAMHD1⁺. We conducted phylogenetics and compartmentalization analyses to investigate the population structure and dynamics of HIV-1 reservoir and elucidate cellular processes that maintain it. Both tree topologies and non-parametric tests revealed well-segregated HIV-1 DNA populations and cell-specific compartmentalization of HIV-1 DNA populations across the three cell subsets, in 10 out of 12 individuals. The compartmentalization between memory and naïve CD4⁺ T cells is consistent with previous studies where distinct HIV-1 DNA populations were observed in various cell subsets including total memory, activated and naïve CD4⁺, blood monocytes and NK cells (Fulcher, Hwangbo et al. 2004, Delobel, Sandres-Saune et al. 2005, Choi, Chaillon et al. 2016). Importantly, we detected sustained compartmentalization between memory SAMHD1⁺ and memory SAMHD1^{low} cells revealing for the first time compartmentalization within the same cell memory pool, i.e cells with differential SAMHD1 expression. Moreover, we observed limited viral exchange originating from

naïve SAMHD1⁺, predominantly directed toward memory SAMHD1⁺ cell subset. In-depth phylogenetic and statistical analyses did not reveal clear divergence between sequences from different HIV-1 populations isolated from the three cell subsets.

In our previous study, we reported that peripheral blood memory SAMHD1^{low} CD4⁺ T cells were enriched in CXCR3⁺CCR6⁺CCR4⁺ Th17 cells and were depleted in HIV-1 infected individuals (Ruffin, Brezar et al. 2015). Th17 cells are presumed to be the most susceptible cells to HIV-1 infection and are preferentially depleted in infected individuals (El Hed, Khaitan et al. 2010, Gosselin, Monteiro et al. 2010, Monteiro, Gosselin et al. 2011, Alvarez, Tuen et al. 2013, Bernier, Cleret-Buhot et al. 2013, Gosselin, Wiche Salinas et al. 2017, Planas, Zhang et al. 2017). Recently, Wacleche et al. revealed the existence of two novel CCR6⁺ subsets: CCR6⁺DP cells that co-express CXCR3 and CCR4 (Wacleche, Goulet et al. 2016, Wacleche, Landay et al. 2017), and CCR6⁺DN cells that lack both molecules, express a unique transcriptional signature of early Th17 and Tfh, are able to proliferate in response to IL-2 and contain replication competent HIV-1. Importantly, this group showed that in contrast to the classical CCR6⁺ subsets (Th17 and Th17Th1) that were depleted in infected individuals, CCR6⁺DN cells were not (Wacleche, Goulet et al. 2016, Wacleche, Landay et al. 2017). Remarkably, we found that CCR6⁺DN cells were preserved in SAMHD1^{low} cells from infected compared to uninfected individuals (8% vs 3.8%), while Th17 SAMHD1^{low} cells were significantly decreased (41% vs 55%, p<0.05). Altogether these data demonstrate that SAMHD1^{low} cells are enriched in Th17 and CCR6⁺DN cells, two major targets and contributors to HIV-1 persistence in peripheral blood.

Moreover, we observed that in contrast to SAMHD1^{low} cells, SAMHD1⁺ cells contain less Th17 in both infected and uninfected individuals (41% vs 15.4% and 55% vs 25%, respectively) and their depletion during infection was non-significant (Figure 2c). However, CCR6⁺DN were more abundant in SAMHD1⁺ than in SAMHD1^{low} (25.6% vs 8% and 14.7% vs 3.8%, respectively), which let us hypothesize that it might be partly due to high SAMHD1 expression, consistent with its role as a restriction factor that inhibits viral life cycle and cell infection and depletion (Hrecka, Hao et al. 2011, Laguette, Sobhian et al. 2011, Baldauf, Pan et al. 2012, Descours, Cribier et al. 2012).

Furthermore, we found that memory SAMHD1⁺ cells from c-ART infected patients, harbored lower HIV-1 DNA copies compared to memory SAMHD1^{low} cells (3.8 vs 4.5

log/10⁶ cells respectively, p=0.009) but these levels were not negligible when compared to naïve SAMHD1⁺ cells (3.8 vs 3.1 log/10⁶ cells respectively, p=0.006). Here again we can hypothesize that the presence of SAMHD1 molecule as a restriction factor might cause hypermutations that lead to the generation of defective proviruses as it has been demonstrated for APOBEC3G another restriction factor (Ho, Shan et al. 2013, Cohn, Silva et al. 2015). Indeed these hypotheses need to be formally demonstrated.

Previous work suggested a role of homeostatic proliferation as a cause of persistence (Chomont, El-Far et al. 2009, Wightman, Solomon et al. 2010). Cytokines such as interleukin 7 (IL-7) and/or interleukin 2 (IL-2), are known to enhance the survival and proliferation of memory CD4⁺ T cells (Geginat, Sallusto et al. 2003, Kondrack, Harbertson et al. 2003, Chomont, El-Far et al. 2009) and IL-7 has also been shown to induce proliferation of latently infected cells without viral reactivation or genetic diversification (Chomont, El-Far et al. 2009, Bosque, Famiglietti et al. 2011). The fact that SAMHD1^{low} cells showed high proliferative capacity *in vivo*, which was positively correlated with HIV-1 DNA, suggested to us that they could be sensitive to IL-7 and/or IL-2 induced-homeostatic proliferation. To this end, we assessed IL-7 receptor alpha-chain (CD127) and IL-2 receptor alpha-chain (CD25) expressions in *ex vivo* memory SAMHD1^{low} and SAMHD1⁺ cells from infected and uninfected individuals. Our data revealed higher CD25 and lower CD127 expressions in SAMHD1^{low} cells compared to SAMHD1⁺ (p<0.05 and supplementary figure 2), ruling out therefore the role of IL-7 in a possible homeostatic proliferation, and suggesting that IL-2 might play a role in this context. Indeed, these observations need to be confirmed.

Our study provides evidence that memory SAMHD1^{low} CD4⁺ T cells with unique features represent an important target for HIV-1 infection. This subset includes highly differentiated and cycling cells that contain high levels of HIV-1 DNA with well-segregated sequence populations and significant compartmentalization with a very limited viral exchange across subsets, i.e naïve and SAMHD1⁺.

The limited sample size and sequenced HIV-1 coding region (parital HIV-1 env) prevent us to rule out that viral exchange may occur between cellular subsets, with other treatment regimens or in other populations. Another limitation of this report is the use

of the 454 sequencing platform, which is more prone to homopolymer-associated, per-base errors (Gilles, Meglecz et al. 2011) and artifact recombination (Shao, Boltz et al. 2013). To overcome this limitation, we applied rigorous quality control procedures for deep sequencing, as previously described in our group and others (Schmieder and Edwards 2011, Watson, Welkers et al. 2013, Chaillon, Gianella et al. 2018). Our validated bioinformatics pipeline includes strict quality filtering steps (Wagner, Pacold et al. 2014, Carter, Wagner et al. 2015, Fisher, Smith et al. 2015) and only quality-controlled reads were included in the analysis (Chaillon, Nakazawa et al. 2017). Future studies using more recent sequencing technologies that are less prone to single-base errors, the use of Primer ID (Zhou, Jones et al. 2015) or single genome amplification/Sanger sequencing (Boltz, Rausch et al. 2016) in different settings could also be enlightening.

Nevertheless, to our knowledge this is the first study revealing such compartmentalizations in viral sequences between cells from the same memory pool. These data provide valuable information for exploring the dynamics of HIV-1 in memory CD4⁺ T cell compartment. Future studies will address whether HIV-1 from SAMHD1^{low} cells is replication-competent. Altogether these data open new avenues for HIV-1 research toward an HIV cure.

Acknowledgements: The authors would like to thank all patients who participated in the study. They also thank P. Tisserand for technical assistance, A. Guguin and A. Henry from IMRB facility for cell sorting.

Funding: This study was funded by the Agence Nationale pour la Recherche sur le SIDA et les hépatites virales (ANRS), the Vaccine Research Institute (VRI).

Author contributions: L.H. designed and performed experiments, analysed the data and wrote the manuscript; A.C. analysed the data, participated to discussions and edited the manuscript; M.L.N. performed experiments; N.R. participated to discussions and edited the manuscript; M.S. analysed the data; D.M.S. edited the manuscript; J.D.L. organized patients recruitment and provided blood samples; C.D. participated to discussions and edited the manuscript; Y.L. organized patients recruitment, provided blood samples, participated to discussions and edited the manuscript; N.S. conceived the study, designed and supervised all experiments, analysed the data and wrote the manuscript.

Competing interests: The authors declare no conflict of interest.

FIGURES & LEGENDS

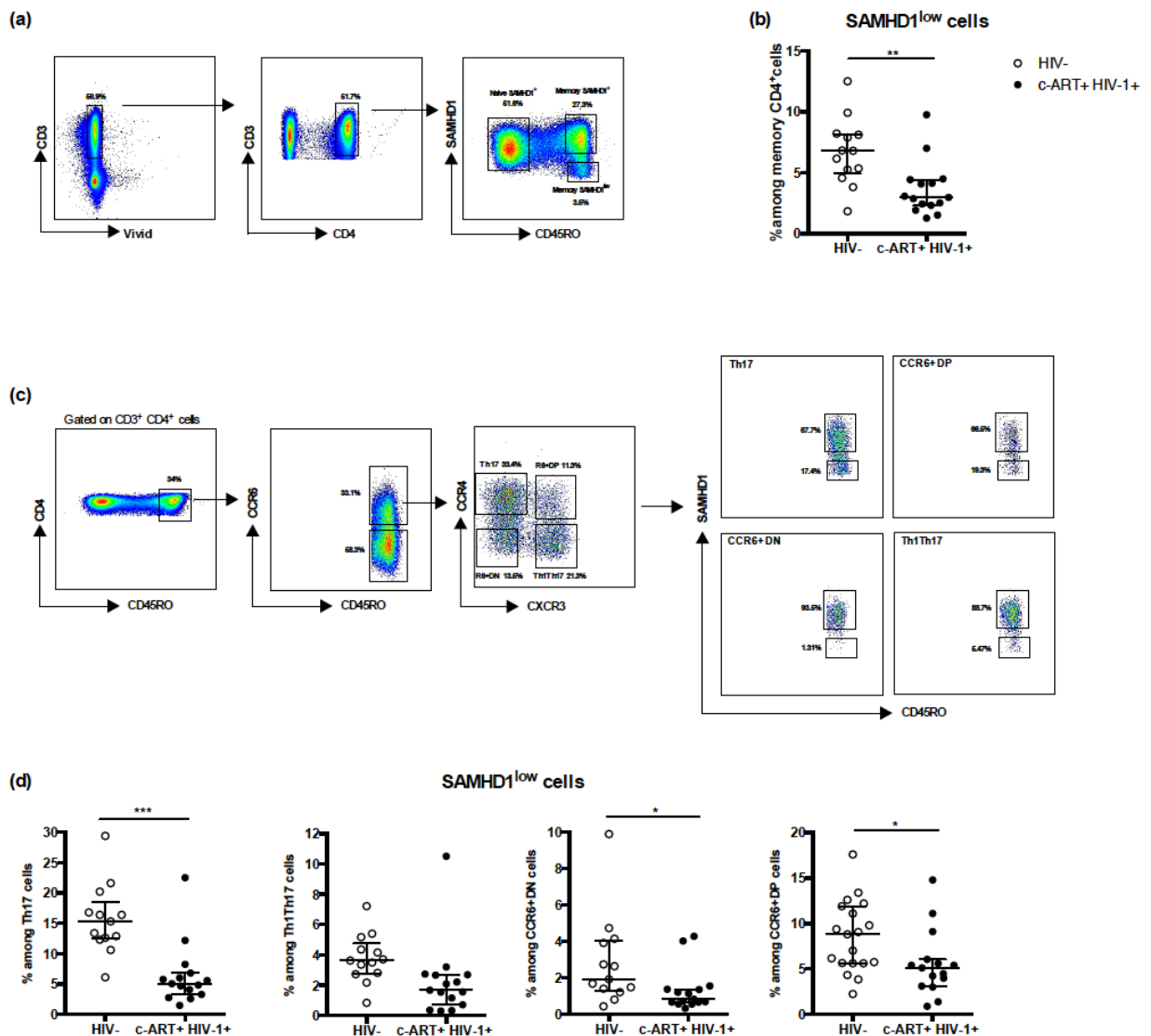


Figure 1. Memory CD4⁺ SAMHD1^{low} cells are depleted in c-ART HIV-1 infected patients and enriched in Th17-polarized CCR6⁺ populations. Fresh PBMCs from HIV-1 negative (HIV-, n=13) and HIV-1 infected individuals receiving c-ART (cART+ HIV-1+, n=17) were stained with a cocktail of fluorochrome-conjugated -CD3, -CD4, -CD45RO, -CXCR3, -CCR4, -CCR6 and -SAMHD1 monoclonal antibodies. A viability staining was used to exclude dead cells. **(a)** Gating strategy for naïve SAMHD1⁺ (CD45RO⁻ SAMHD1⁺), memory SAMHD1⁺ (CD45RO⁺ SAMHD1⁺), memory SAMHD1^{low} (CD45RO⁺ SAMHD1^{low}) cells. **(b)** Percentages of memory SAMHD1^{low} cells among total memory CD4⁺ T-cells from HIV- and c-ART+ HIV-1+ patients. **(c)** Gating strategy for memory SAMHD1⁺ and SAMHD1^{low} cells among T helper 17 (Th17: CD45RO⁺ CXCR3⁻ CCR4⁺ CCR6⁺), Th1/Th17 (CD45RO⁺ CXCR3⁺ CCR4⁻ CCR6⁺), CCR6⁺ double positive DP (CCR6⁺ CXCR3⁺ CCR4⁺), CCR6⁺ double negative DN (CCR6⁺ CXCR3⁻ CCR4⁻) cells. **(d)** Percentages of CCR6⁺ Th17, Th1/17, R6⁺ (CCR6⁺) DN, R6⁺DN cells among gated memory SAMHD1^{low} CD4⁺ T-cells in uninfected vs HIV infected individuals. Data represent median with interquartile range. *p<0.05, **p<0.01 and ***p<0.001, t-test, one-way and 2-way ANNOVA tests followed by Bonferroni post-tests.

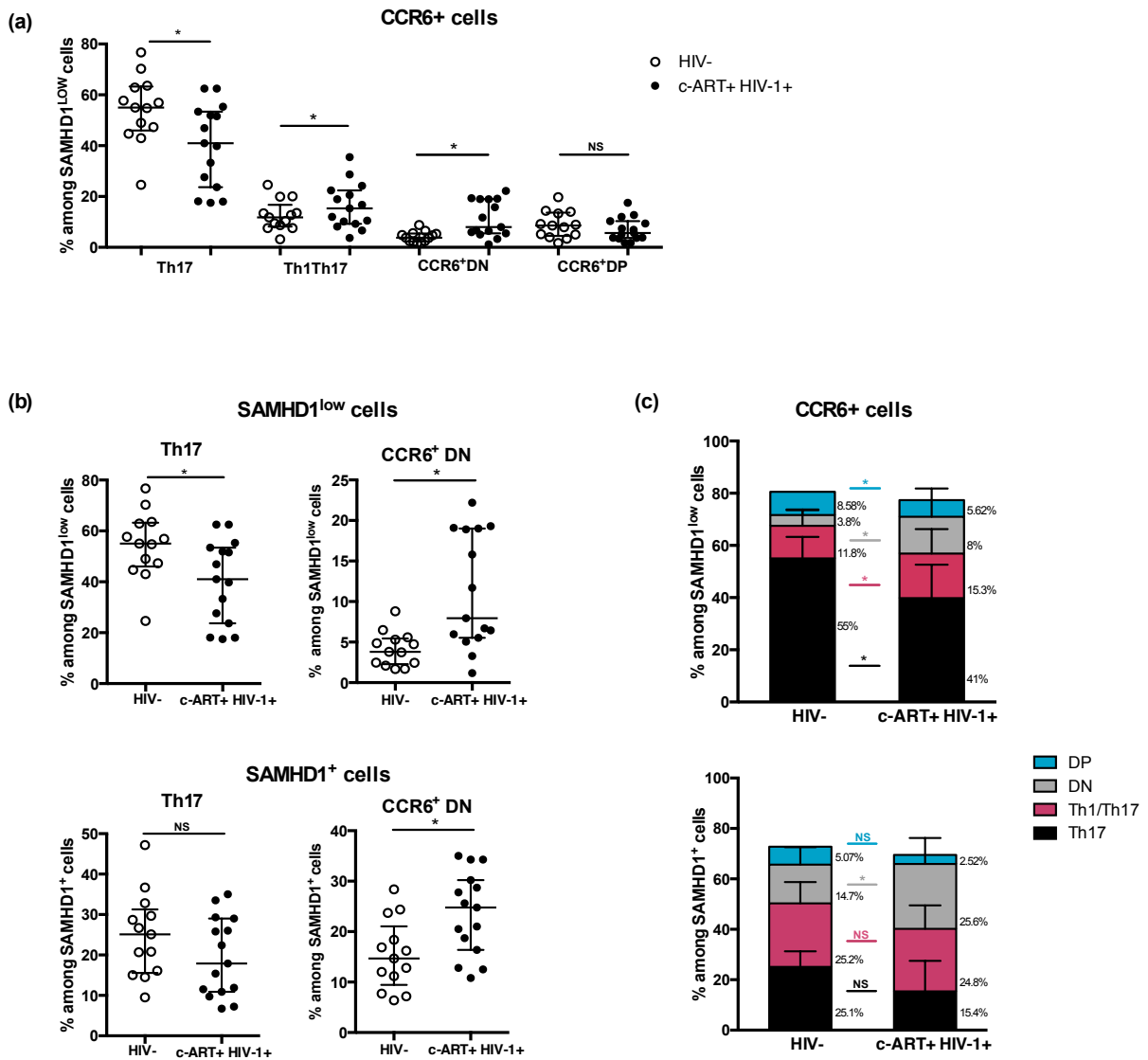


Figure 2. Memory CD4⁺ SAMHD1^{low} cells are enriched in Th17 cells. (a) Percentages of CCR6⁺ Th17, Th1/17, R6⁺DP, R6⁺DN cells among gated memory SAMHD1^{low} CD4⁺ T-cells in uninfected vs HIV infected individuals (b) Percentages of CCR6⁺ Th17 and R6⁺DN cells among gated memory SAMHD1^{low} and SAMHD1⁺ CD4⁺ T-cells in uninfected vs HIV infected individuals. (c) Percentages of CCR6⁺ Th17, Th1/17, R6⁺DP and R6⁺DN cells among gated memory SAMHD1^{low} and SAMHD1⁺ CD4⁺ T-cells. Data represent median with interquartile range. *p<0.05, **p<0.01 and ***p<0.001, t-test, one-way and 2-way ANNOVA tests followed by Bonferroni post-tests.

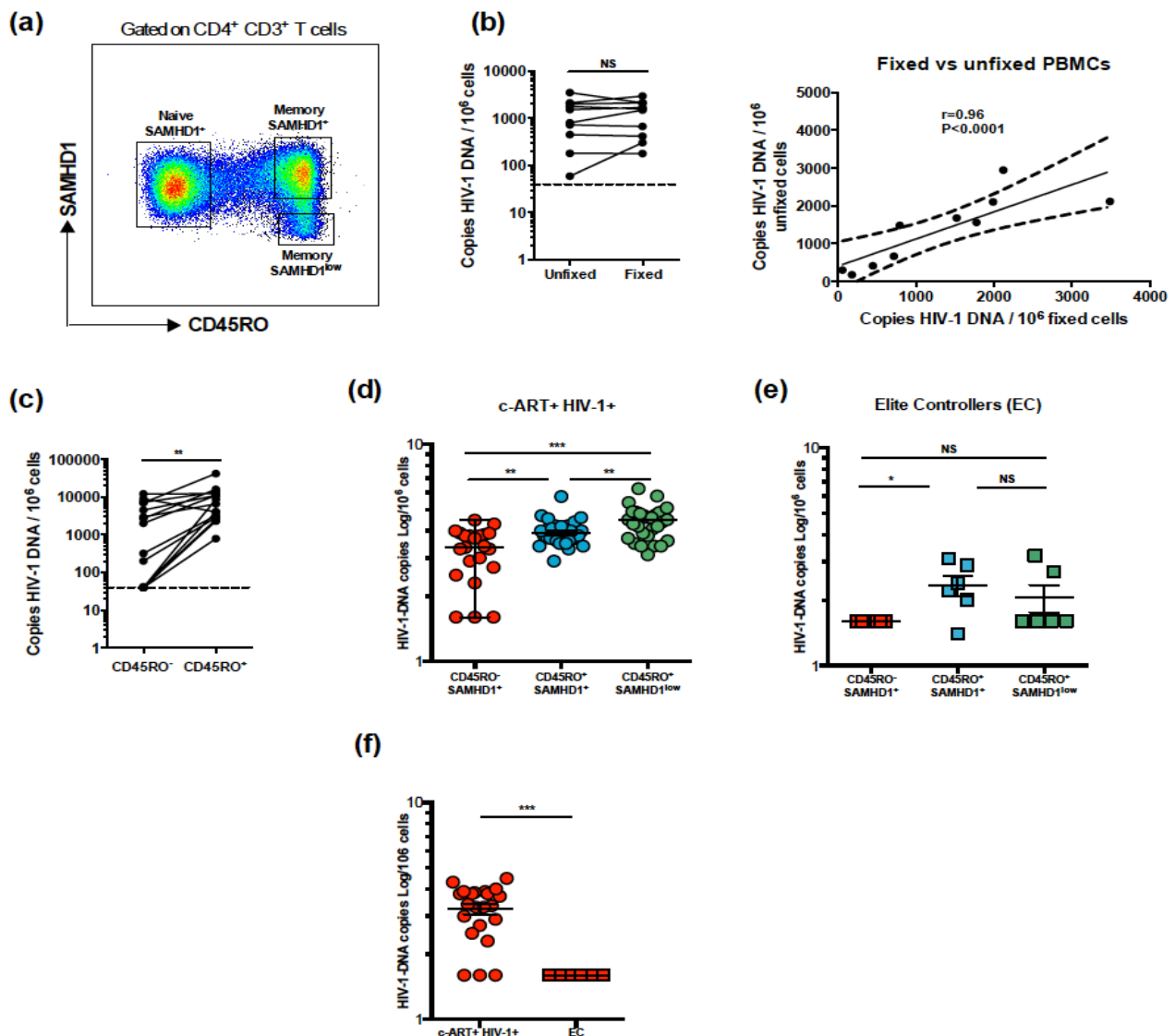


Figure 3. Memory CD4⁺ CD45RO⁺ SAMHD1^{low} cells exhibit the highest level of HIV-1 DNA. Peripheral blood samples were collected from 36 HIV-infected individuals receiving c-ART and 6 Elite Controller. Fresh PBMCs were stained with anti-CD3, -CD4, -CD45RO and -SAMHD1. The three cell subsets: memory CD4⁺ CD45RO⁺ SAMHD1^{low}, CD4⁺ CD45RO⁺ SAMHD1⁺ and naive CD4⁺ CD45RO⁻ SAMHD1⁺ were sorted by FACS. Protocols for DNA extraction and PCR experiments on permeabilized and fixed cells have been optimized using bulk PBMCs from 10 HIV-1 infected individuals receiving c-ART. Levels of total HIV-1 DNA were quantified by Nested real-time PCR in sorted cells *ex vivo*. **(a)** Gating strategy for memory CD4⁺CD45RO⁺SAMHD1^{low}, CD4⁺CD45RO⁺SAMHD1⁺ and naive CD4⁺CD45RO⁻SAMHD1⁺. **(b)** Levels of total HIV-1 DNA in unfixed PBMCs from HIV-1 infected individuals receiving c-ART (n=10) compared head-to-head with fixed PBMCs from the same individuals. **(c)** Levels of total HIV-1 DNA in sorted memory CD45RO⁺ and naïve CD45RO⁻ cells. **(d)** Levels of total HIV-1 DNA in sorted memory CD4⁺CD45RO⁺SAMHD1^{low}, CD4⁺CD45RO⁺SAMHD1⁺ and naive CD4⁺CD45RO⁻SAMHD1⁺ from HIV-1 infected individuals receiving c-ART. **(e)** Levels of total HIV-1 DNA in sorted memory CD4⁺CD45RO⁺SAMHD1^{low}, CD4⁺CD45RO⁺SAMHD1⁺ and naive CD4⁺CD45RO⁻SAMHD1⁺ from Elite Controllers (HIV+ EC). **(f)** Levels of total HIV-1 DNA in sorted naive CD4⁺CD45RO⁻SAMHD1⁺ from HIV-1 infected individuals receiving c-ART and Elite Controllers. Data represent median with interquartile range. *p<0.05, **p<0.01 and ***p<0.001, t-test, one-way and 2-way ANNOVA tests followed by Bonferroni post-tests.

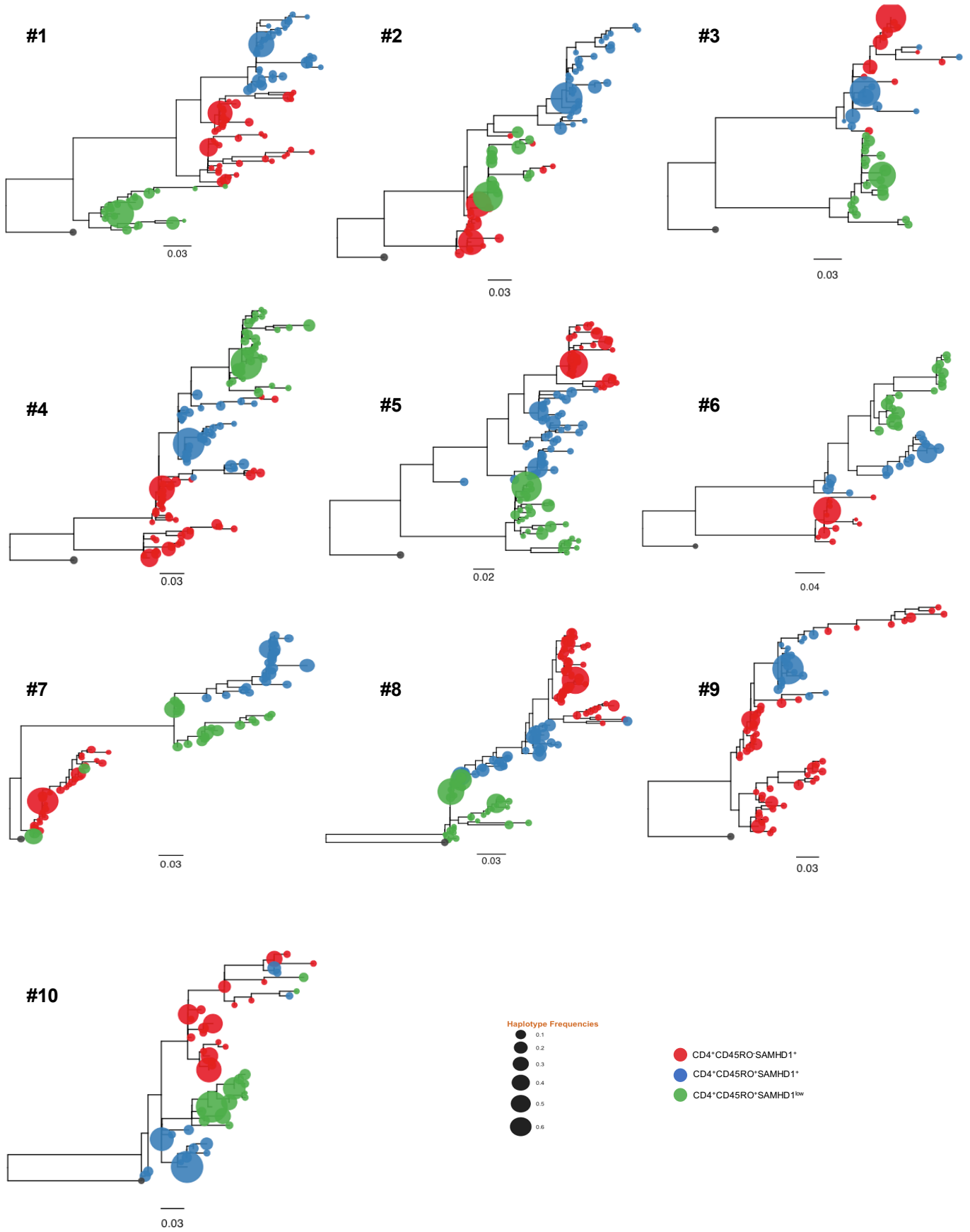


Figure 4. Distinct/well-segregated HIV-1 DNA populations in both memory CD4⁺ CD45RO⁺ SAMHD1^{low}, CD4⁺ CD45RO⁺ SAMHD1⁺ and naive CD4⁺ CD45RO⁻ SAMHD1⁺ subsets. Ultra-deep-sequencing (UDS, 454/Roche) of partial *env* (C2/V3) HIV-1 DNA (n=12 HIV-1 infected individuals receiving c-ART) was performed. Neighbor-joining phylogenetic trees representing compartmentalized and equilibrated viral populations in 10 patients out of 12 studied patients. Genetic distance is indicated with a scale bar (number of nucleotide substitutions per site). Shown are results for the 10 individuals. HIV haplotypes were extracted from reads covering partial *Env*. *Env* sequences from naive CD4⁺CD45RO⁻SAMHD1⁺, memory CD4⁺CD45RO⁺SAMHD1⁺ and CD4⁺CD45RO⁺SAMHD1^{low} are depicted in red, blue, and green, respectively. Tip size is proportional to variant frequency. Scale bars are in substitutions/site.

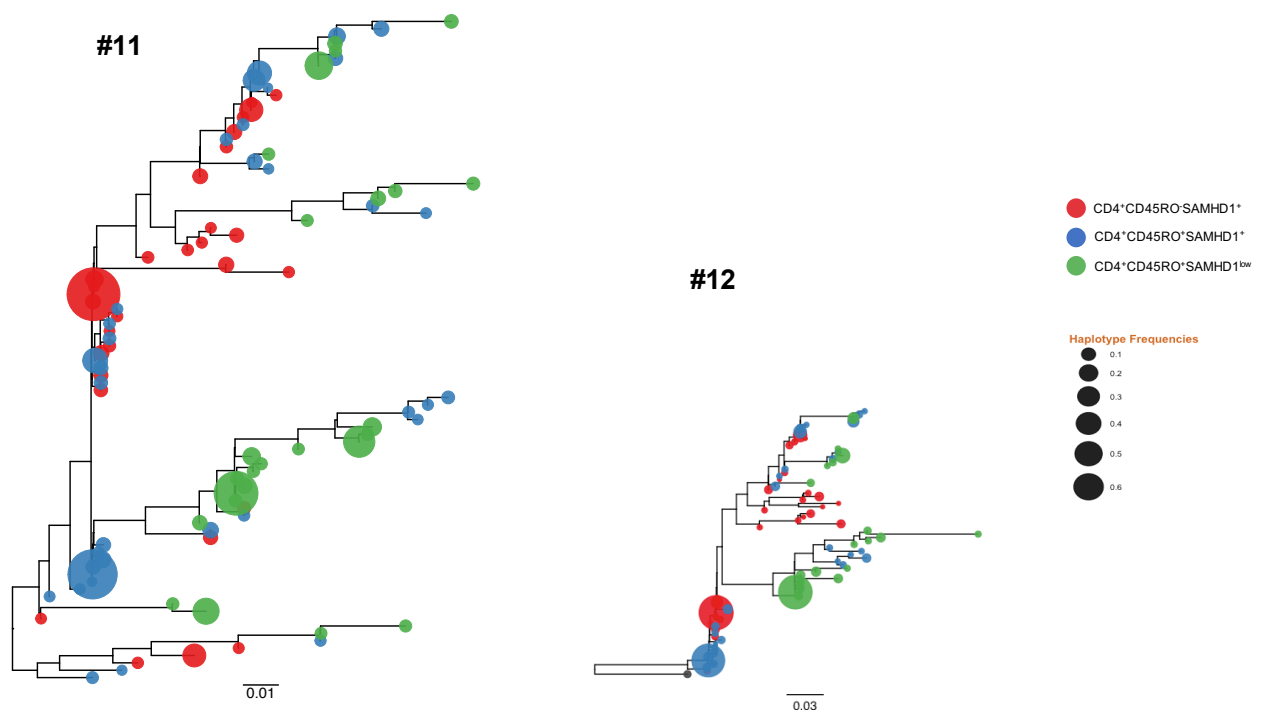


Figure 5. Non-compartmentalization of HIV-1 DNA populations in both memory CD4⁺ CD45RO⁺ SAMHD1^{low}, CD4⁺ CD45RO⁺ SAMHD1⁺ and naive CD4⁺ CD45RO⁻ SAMHD1⁺ subsets in 2 patients out of the 12 studied patients. 2 individuals with non-compartmentalization and mixed-up haplotypes.

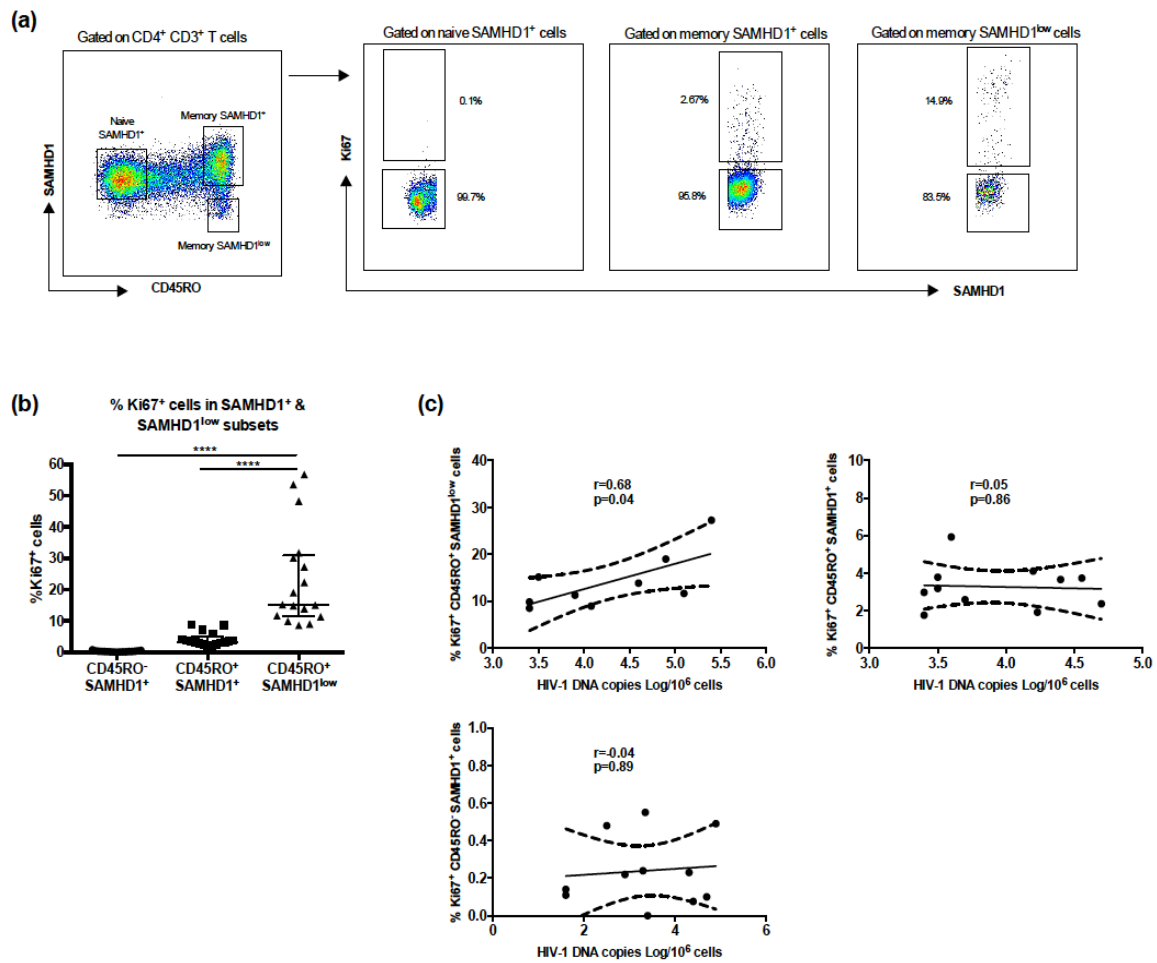
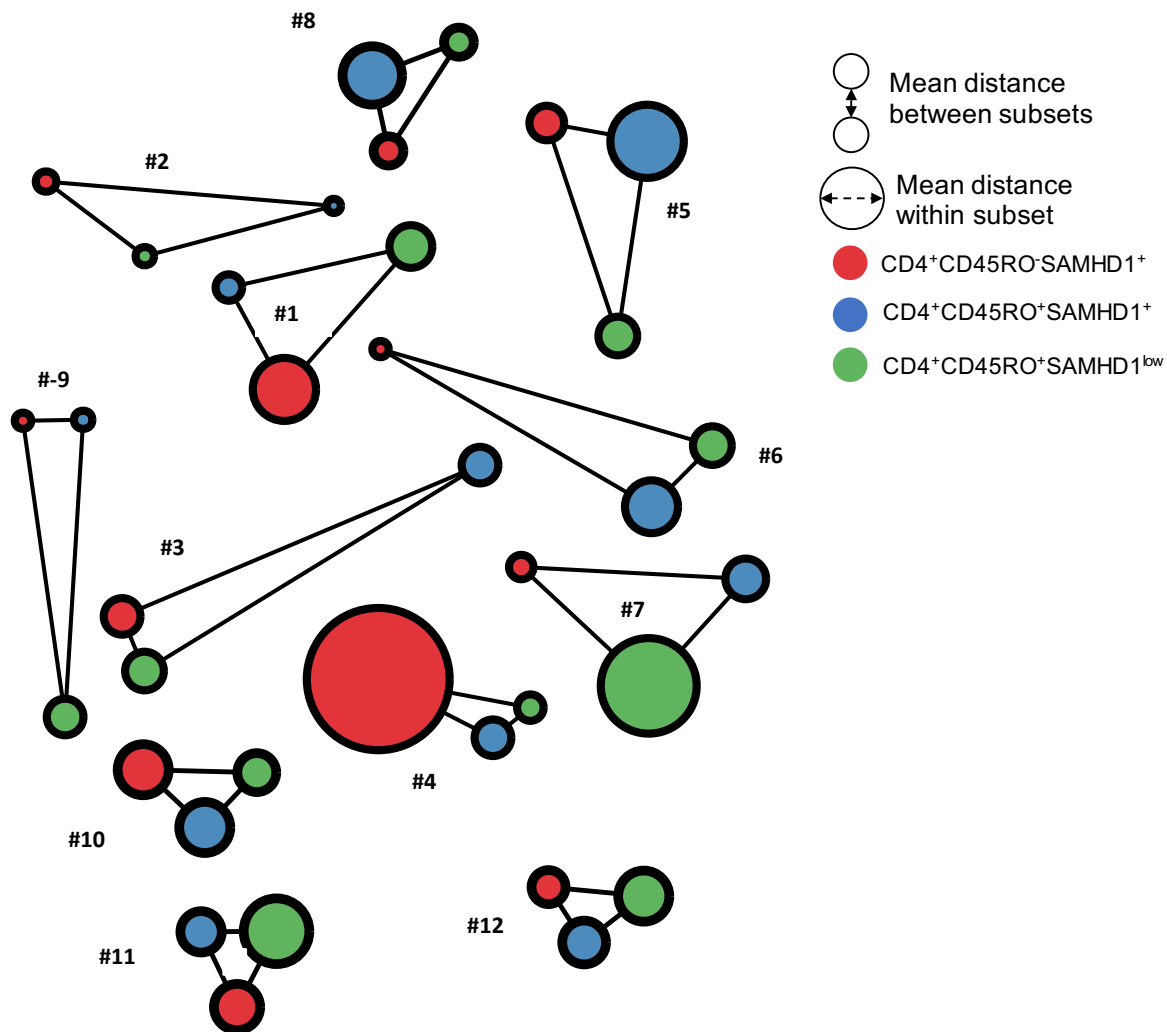
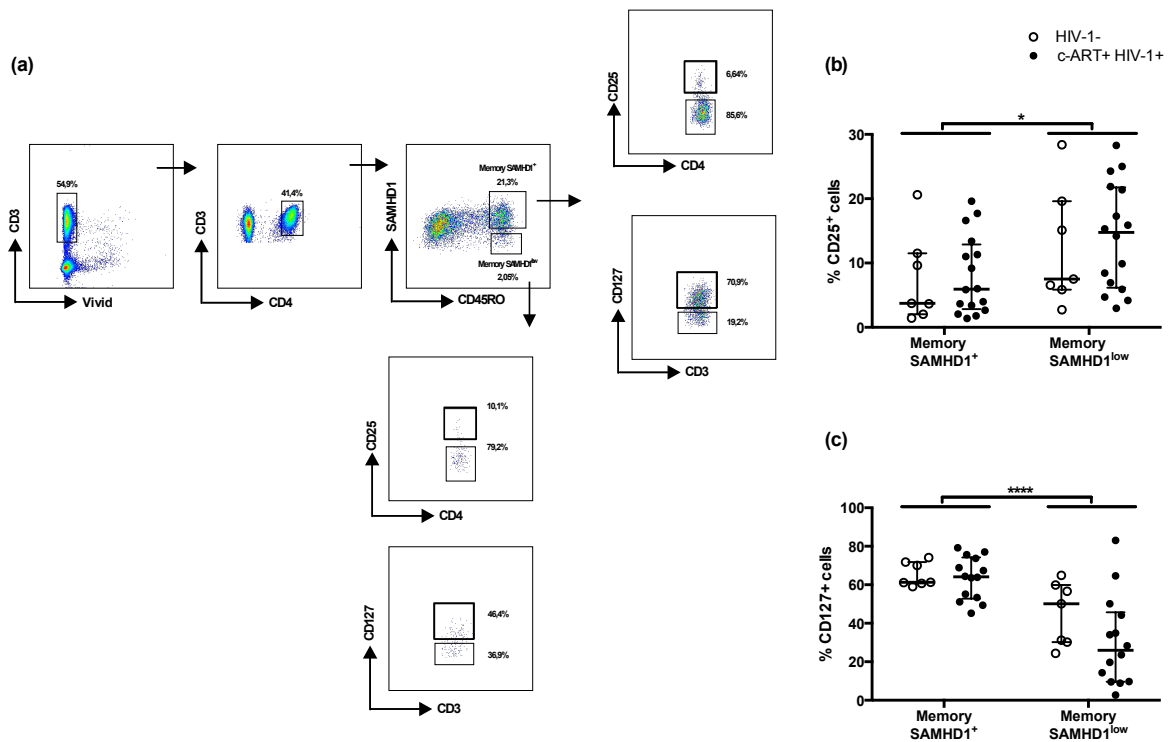


Figure 6. Total HIV-1 DNA levels positively correlate with Ki67 expression in memory SAMHD1^{low} cells. Frozen PBMCs from HIV-1 infected individuals receiving cART (cART⁺ HIV-1⁺, n=17) were stained with a cocktail of fluorochrome-conjugated -CD3, -CD4, -CD45RO, and -SAMHD1 monoclonal antibodies. A viability staining was used to exclude dead cells. **(a)** Gating strategy for Ki67⁺ and Ki67⁻ cells among naïve SAMHD1⁺ (CD45RO⁻ SAMHD1⁺), memory SAMHD1⁺ (CD45RO⁺ SAMHD1⁺) and memory SAMHD1^{low} (CD45RO⁺ SAMHD1^{low}) compartments. **(b)** Percentages of Ki67⁺ cells amongst SAMHD1⁺ and SAMHD1^{low} CD4⁺ T cells. **(c)** Correlations between HIV-1 DNA levels and Ki67 expression of naïve SAMHD1⁺ (CD45RO⁻ SAMHD1⁺), memory SAMHD1⁺ (CD45RO⁺ SAMHD1⁺) and memory SAMHD1^{low} (CD45RO⁺ SAMHD1^{low}) cells. Data represent median with interquartile range. *p<0.05, **p<0.01 and ***p<0.001, t-test, one-way and 2-way ANNOVA tests followed by Bonferroni post-tests.



Supplementary figure 1. Represented are mean distances between subsets and mean distances within each subset (Tip size is proportional to distance). Ultra-deep-sequencing (UDS, 454/Roche) of partial *env* (C2/V3) HIV-1 DNA (n=12 HIV-1 infected individuals receiving c-ART) was performed. Shown are results for the 12 individuals. HIV haplotypes were extracted from reads covering partial *Env*. *Env* sequences from naive CD4⁺CD45RO-SAMHD1⁺, memory CD4⁺CD45RO⁺SAMHD1⁺ and CD4⁺CD45RO⁺SAMHD1^{low} are depicted in red, blue, and green, respectively. Scale bars are in substitutions/site.



Supplementary figure 2. Higher CD25 and lower CD127 expressions in SAMHD1^{low} cells compared to SAMHD1⁺ cells. Fresh PBMCs from HIV-1 negative (HIV-1, n=7) and HIV-1 infected individuals receiving c-ART (cART+ HIV-1+, n=16) were stained with a cocktail of fluorochrome-conjugated -CD3, -CD4, -CD45RO, -CD127, -CD25 and -SAMHD1 monoclonal antibodies. A viability staining was used to exclude dead cells. **(a)** Gating strategy for memory SAMHD1⁺ (CD45RO⁺SAMHD1⁺), memory SAMHD1^{low} (CD45RO⁺SAMHD1^{low}), CD25⁺ and CD127⁺ cells. **(b)** Percentages of CD25⁺ cells among memory SAMHD1^{low} and memory SAMHD1⁺ CD4⁺ T-cells from HIV-1- and c-ART+ HIV-1+ patients. **(c)** Percentages of CD127⁺ cells among memory SAMHD1^{low} and memory SAMHD1⁺ CD4⁺ T-cells from HIV-1- and c-ART+ HIV-1+ patients. Data represent median with interquartile range. *p<0.05, **p<0.01 and ***p<0.001, t-test, one-way and 2-way ANNOVA tests followed by Bonferroni post-tests.

Table 1. Patients' characteristics.

Table 1. Characteristics of the study population

Characteristics of the study population										
	n	Age in years median (range)	Gender M/F	Median time since HIV-1 diagnostic years (range)	Median treatment duration years (range)	CD4 count in cells/ml of plasma median (range)	CD8 count in cells/ml of plasma median (range)	CD3 count in cells/ml of plasma median (range)	Copies HIV-1 RNA/ml of plasma median (range)	Nadir CD4
c-ART+ HIV-1+	49	53 (34-75)	30/19 61.2%/38.7%	NA	14 (1-34)	572.5 (129-1393)	583 (242-1257)	1161.5 (576-2410)	<20 (0-86)	185 (4-545)
EC	6	46.5 (26-55)	2/4 33%/67%	30 (5-33)	NA	900 (737-1483)	775 (337-1220)	1789.3 (1123-2520)	94 (0-308)	657.5 (332-1110)

Characteristics of the c-ART+ HIV-1+ patients and Elite Controllers involved in the study. Gender M: male, F: female. NA: non-attributable.

REFERENCES

- Alvarez, Y., M. Tuen, G. Shen, F. Nawaz, J. Arthos, M. J. Wolff, M. A. Poles and C. E. Hioe (2013). "Preferential HIV infection of CCR6+ Th17 cells is associated with higher levels of virus receptor expression and lack of CCR5 ligands." *J Virol* **87**(19): 10843-10854.
- Andersson, J., A. Boasso, J. Nilsson, R. Zhang, N. J. Shire, S. Lindback, G. M. Shearer and C. A. Chougnet (2005). "The prevalence of regulatory T cells in lymphoid tissue is correlated with viral load in HIV-infected patients." *J Immunol* **174**(6): 3143-3147.
- Baldauf, H. M., X. Pan, E. Erikson, S. Schmidt, W. Daddacha, M. Burggraf, K. Schenkova, I. Ambiel, G. Wabnitz, T. Gramberg, S. Panitz, E. Flory, N. R. Landau, S. Sertel, F. Rutsch, F. Lasitschka, B. Kim, R. Konig, O. T. Fackler and O. T. Keppler (2012). "SAMHD1 restricts HIV-1 infection in resting CD4(+) T cells." *Nat Med* **18**(11): 1682-1687.
- Banga, R., F. A. Procopio, A. Noto, G. Pollakis, M. Cavassini, K. Ohmiti, J. M. Corpataux, L. de Leval, G. Pantaleo and M. Perreau (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.
- Bernier, A., A. Cleret-Buhot, Y. Zhang, J. P. Goulet, P. Monteiro, A. Gosselin, S. DaFonseca, V. S. Wacleche, M. A. Jenabian, J. P. Routy, C. Tremblay and P. Ancuta (2013). "Transcriptional profiling reveals molecular signatures associated with HIV permissiveness in Th1Th17 cells and identifies peroxisome proliferator-activated receptor gamma as an intrinsic negative regulator of viral replication." *Retrovirology* **10**: 160.
- Boltz, V. F., J. Rausch, W. Shao, J. Hattori, B. Luke, F. Maldarelli, J. W. Mellors, M. F. Kearney and J. M. Coffin (2016). "Ultrasensitive single-genome sequencing: accurate, targeted, next generation sequencing of HIV-1 RNA." *Retrovirology* **13**(1): 87.
- Boritz, E. A., S. Darko, L. Swaszek, G. Wolf, D. Wells, X. Wu, A. R. Henry, F. Laboune, J. Hu, D. Ambrozak, M. S. Hughes, R. Hoh, J. P. Casazza, A. Vostal, D. Bunis, K. Nganou-Makamdop, J. S. Lee, S. A. Migueles, R. A. Koup, M. Connors, S. Moir, T. Schacker, F. Maldarelli, S. H. Hughes, S. G. Deeks and D. C. Douek (2016). "Multiple Origins of Virus Persistence during Natural Control of HIV Infection." *Cell* **166**(4): 1004-1015.
- Bosque, A., M. Famiglietti, A. S. Weyrich, C. Goulston and V. Planelles (2011). "Homeostatic proliferation fails to efficiently reactivate HIV-1 latently infected central memory CD4+ T cells." *PLoS Pathog* **7**(10): e1002288.
- Butler, D. M., W. Delport, S. L. Kosakovsky Pond, M. K. Lakdawala, P. M. Cheng, S. J. Little, D. D. Richman and D. M. Smith (2010). "The origins of sexually transmitted HIV among men who have sex with men." *Sci Transl Med* **2**(18): 18re11.
- Buzon, M. J., H. Sun, C. Li, A. Shaw, K. Seiss, Z. Ouyang, E. Martin-Gayo, J. Leng, T. J. Henrich, J. Z. Li, F. Pereyra, R. Zurakowski, B. D. Walker, E. S. Rosenberg, X. G. Yu and M. Lichterfeld (2014). "HIV-1 persistence in CD4+ T cells with stem cell-like properties." *Nat Med* **20**(2): 139-142.
- Carter, C. C., G. A. Wagner, G. K. Hightower, G. Caballero, P. Phung, D. D. Richman, S. L. Pond and D. M. Smith (2015). "HIV-1 neutralizing antibody response and viral genetic diversity characterized with next generation sequencing." *Virology* **474**: 34-40.
- Chaillon, A., S. Gianella, S. M. Lada, J. Perez-Santiago, P. Jordan, C. Ignacio, M. Karris, D. D. Richman, S. R. Mehta, S. J. Little, J. O. Wertheim and D. M. Smith (2018). "Size, Composition, and Evolution of HIV DNA Populations during Early Antiretroviral Therapy and Intensification with Maraviroc." *J Virol* **92**(3).
- Chaillon, A., S. Gianella, J. O. Wertheim, D. D. Richman, S. R. Mehta and D. M. Smith (2014). "HIV migration between blood and cerebrospinal fluid or semen over time." *J Infect Dis* **209**(10): 1642-1652.
- Chaillon, A., M. Nakazawa, J. O. Wertheim, S. J. Little, D. M. Smith, S. R. Mehta and S. Gianella (2017). "No Substantial Evidence for Sexual Transmission of Minority HIV Drug Resistance Mutations in Men Who Have Sex with Men." *J Virol* **91**(21).
- Choi, J. Y., A. Chaillon, J. O. Oh, J. Y. Ahn, H. W. Ann, I. Y. Jung, M. Y. Ahn, Y. D. Jeon, N. S. Ku, D. M. Smith and J. M. Kim (2016). "HIV migration between blood plasma and cellular subsets before and after HIV therapy." *J Med Virol* **88**(4): 606-613.

Chomont, N., M. El-Far, P. Ancuta, L. Trautmann, F. A. Procopio, B. Yassine-Diab, G. Boucher, M. R. Boulassel, G. Ghattas, J. M. Brenchley, T. W. Schacker, B. J. Hill, D. C. Douek, J. P. Routy, E. K. Haddad and R. P. Sekaly (2009). "HIV reservoir size and persistence are driven by T cell survival and homeostatic proliferation." *Nat Med* **15**(8): 893-900.

Chun, T. W., D. Finzi, J. Margolick, K. Chadwick, D. Schwartz and R. F. Siliciano (1995). "In vivo fate of HIV-1-infected T cells: quantitative analysis of the transition to stable latency." *Nat Med* **1**(12): 1284-1290.

Chun, T. W., L. Stuyver, S. B. Mizell, L. A. Ehler, J. A. Mican, M. Baseler, A. L. Lloyd, M. A. Nowak and A. S. Fauci (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.

Cohn, L. B., I. T. Silva, T. Y. Oliveira, R. A. Rosales, E. H. Parrish, G. H. Learn, B. H. Hahn, J. L. Czartoski, M. J. McElrath, C. Lehmann, F. Klein, M. Caskey, B. D. Walker, J. D. Siliciano, R. F. Siliciano, M. Jankovic and M. C. Nussenzweig (2015). "HIV-1 integration landscape during latent and active infection." *Cell* **160**(3): 420-432.

Cribier, A., B. Descours, A. L. Valadao, N. Laguette and M. Benkirane (2013). "Phosphorylation of SAMHD1 by cyclin A2/CDK1 regulates its restriction activity toward HIV-1." *Cell Rep* **3**(4): 1036-1043.

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

Delobel, P., K. Sandres-Saune, M. Cazabat, F. E. L'Faqihi, C. Aquilina, M. Obadia, C. Pasquier, B. Marchou, P. Massip and J. Izopet (2005). "Persistence of distinct HIV-1 populations in blood monocytes and naive and memory CD4 T cells during prolonged suppressive HAART." *AIDS* **19**(16): 1739-1750.

Descours, B., A. Cribier, C. Chable-Bessia, D. Ayinde, G. Rice, Y. Crow, A. Yatim, O. Schwartz, N. Laguette and M. Benkirane (2012). "SAMHD1 restricts HIV-1 reverse transcription in quiescent CD4(+) T-cells." *Retrovirology* **9**: 87.

El Hed, A., A. Khaitan, L. Kozhaya, N. Manel, D. Daskalakis, W. Borkowsky, F. Valentine, D. R. Littman and D. Unutmaz (2010). "Susceptibility of human Th17 cells to human immunodeficiency virus and their perturbation during infection." *J Infect Dis* **201**(6): 843-854.

Finzi, D., J. Blankson, J. D. Siliciano, J. B. Margolick, K. Chadwick, T. Pierson, K. Smith, J. Lisiewicz, F. Lori, C. Flexner, T. C. Quinn, R. E. Chaisson, E. Rosenberg, B. Walker, S. Gange, J. Gallant and R. F. Siliciano (1999). "Latent infection of CD4+ T cells provides a mechanism for lifelong persistence of HIV-1, even in patients on effective combination therapy." *Nat Med* **5**(5): 512-517.

Finzi, D., M. Hermankova, T. Pierson, L. M. Carruth, C. Buck, R. E. Chaisson, T. C. Quinn, K. Chadwick, J. Margolick, R. Brookmeyer, J. Gallant, M. Markowitz, D. D. Ho, D. D. Richman and R. F. Siliciano (1997). "Identification of a reservoir for HIV-1 in patients on highly active antiretroviral therapy." *Science* **278**(5341): 1295-1300.

Fisher, R. G., D. M. Smith, B. Murrell, R. Slabbert, B. M. Kirby, C. Edson, M. F. Cotton, R. H. Haubrich, S. L. Kosakovsky Pond and G. U. Van Zyl (2015). "Next generation sequencing improves detection of drug resistance mutations in infants after PMTCT failure." *J Clin Virol* **62**: 48-53.

Fletcher, C. V., K. Staskus, S. W. Wietgreffe, M. Rothenberger, C. Reilly, J. G. Chipman, G. J. Beilman, A. Khoruts, A. Thorkelson, T. E. Schmidt, J. Anderson, K. Perkey, M. Stevenson, A. S. Perelson, D. C. Douek, A. T. Haase and T. W. Schacker (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.

Fulcher, J. A., Y. Hwangbo, R. Zioni, D. Nickle, X. Lin, L. Heath, J. I. Mullins, L. Corey and T. Zhu (2004). "Compartmentalization of human immunodeficiency virus type 1 between blood monocytes and CD4+ T cells during infection." *J Virol* **78**(15): 7883-7893.

Geginat, J., F. Sallusto and A. Lanzavecchia (2003). "Cytokine-driven proliferation and differentiation of human naive, central memory and effector memory CD4+ T cells." *Pathol Biol (Paris)* **51**(2): 64-66.

Gianella, S., S. R. Mehta, M. C. Strain, J. A. Young, M. V. Vargas, S. J. Little, D. D. Richman, S. L. Kosakovsky Pond and D. M. Smith (2012). "Impact of seminal cytomegalovirus replication on HIV-1 dynamics between blood and semen." *J Med Virol* **84**(11): 1703-1709.

Gilles, A., E. Meglec, N. Pech, S. Ferreira, T. Malausa and J. F. Martin (2011). "Accuracy and quality assessment of 454 GS-FLX Titanium pyrosequencing." *BMC Genomics* **12**: 245.

Gosselin, A., P. Monteiro, N. Chomont, F. Diaz-Griffero, E. A. Said, S. Fonseca, V. Wacleche, M. El-Far, M. R. Boulassel, J. P. Routy, R. P. Sekaly and P. Ancuta (2010). "Peripheral blood CCR4+CCR6+ and CXCR3+CCR6+CD4+ T cells are highly permissive to HIV-1 infection." *J Immunol* **184**(3): 1604-1616.

Gosselin, A., T. R. Wiche Salinas, D. Planas, V. S. Wacleche, Y. Zhang, R. Fromentin, N. Chomont, E. A. Cohen, B. Shacklett, V. Mehraj, M. P. Ghali, J. P. Routy and P. Ancuta (2017). "HIV persists in CCR6+CD4+ T cells from colon and blood during antiretroviral therapy." *AIDS* **31**(1): 35-48.

Ho, Y. C., L. Shan, N. N. Hosmane, J. Wang, S. B. Laskey, D. I. Rosenbloom, J. Lai, J. N. Blankson, J. D. Siliciano and R. F. Siliciano (2013). "Replication-competent noninduced proviruses in the latent reservoir increase barrier to HIV-1 cure." *Cell* **155**(3): 540-551.

Hrecka, K., C. Hao, M. Gierszewska, S. K. Swanson, M. Kesik-Brodacka, S. Srivastava, L. Florens, M. P. Washburn and J. Skowronski (2011). "Vpx relieves inhibition of HIV-1 infection of macrophages mediated by the SAMHD1 protein." *Nature* **474**(7353): 658-661.

International, A. S. S. W. G. o. H. I. V. C., S. G. Deeks, B. Autran, B. Berkhout, M. Benkirane, S. Cairns, N. Chomont, T. W. Chun, M. Churchill, M. Di Mascio, C. Katlama, A. Lafeuillade, A. Landay, M. Lederman, S. R. Lewin, F. Maldarelli, D. Margolis, M. Markowitz, J. Martinez-Picado, J. I. Mullins, J. Mellors, S. Moreno, U. O'Doherty, S. Palmer, M. C. Penicaud, M. Peterlin, G. Poli, J. P. Routy, C. Rouzioux, G. Silvestri, M. Stevenson, A. Telenti, C. Van Lint, E. Verdin, A. Woolfrey, J. Zaia and F. Barre-Sinoussi (2012). "Towards an HIV cure: a global scientific strategy." *Nat Rev Immunol* **12**(8): 607-614.

Jaafoura, S., M. G. de Goer de Herve, E. A. Hernandez-Vargas, H. Hendel-Chavez, M. Abdo, M. C. Mateo, R. Krzysiek, M. Merad, R. Seng, M. Tardieu, J. F. Delfraissy, C. Goujard and Y. Taoufik (2014). "Progressive contraction of the latent HIV reservoir around a core of less-differentiated CD4(+) memory T Cells." *Nat Commun* **5**: 5407.

Kane, M., S. V. Rebersburg, M. A. Takata, T. M. Zang, M. Yamashita, M. Kvaratskhelia and P. D. Bieniasz (2018). "Nuclear pore heterogeneity influences HIV-1 infection and the antiviral activity of MX2." *Elife* **7**.

Khoury, G., J. L. Anderson, R. Fromentin, W. Hartogenesis, M. Z. Smith, P. Bacchetti, F. M. Hecht, N. Chomont, P. U. Cameron, S. G. Deeks and S. R. Lewin (2016). "Persistence of integrated HIV DNA in CXCR3 + CCR6 + memory CD4+ T cells in HIV-infected individuals on antiretroviral therapy." *AIDS* **30**(10): 1511-1520.

Kondrack, R. M., J. Harbertson, J. T. Tan, M. E. McBreen, C. D. Surh and L. M. Bradley (2003). "Interleukin 7 regulates the survival and generation of memory CD4 cells." *J Exp Med* **198**(12): 1797-1806.

Kulpa, D. A. and N. Chomont (2015). "HIV persistence in the setting of antiretroviral therapy: when, where and how does HIV hide?" *J Virus Erad* **1**(2): 59-66.

Laguette, N., B. Sobhian, N. Casartelli, M. Ringeard, C. Chable-Bessia, E. Segeal, A. Yatim, S. Emiliani, O. Schwartz and M. Benkirane (2011). "SAMHD1 is the dendritic- and myeloid-cell-specific HIV-1 restriction factor counteracted by Vpx." *Nature* **474**(7353): 654-657.

Lahouassa, H., W. Daddacha, H. Hofmann, D. Ayinde, E. C. Logue, L. Dragin, N. Bloch, C. Maudet, M. Bertrand, T. Gramberg, G. Pancino, S. Priet, B. Canard, N. Laguette, M. Benkirane, C. Transy, N. R. Landau, B. Kim and F. Margottin-Goguet (2012). "SAMHD1 restricts the replication of human immunodeficiency virus type 1 by depleting the intracellular pool of deoxynucleoside triphosphates." *Nat Immunol* **13**(3): 223-228.

Maldarelli, F., X. Wu, L. Su, F. R. Simonetti, W. Shao, S. Hill, J. Spindler, A. L. Ferris, J. W. Mellors, M. F. Kearney, J. M. Coffin and S. H. Hughes (2014). "HIV latency. Specific HIV integration sites are linked to clonal expansion and persistence of infected cells." *Science* **345**(6193): 179-183.

Monteiro, P., A. Gosselin, V. S. Wacleche, M. El-Far, E. A. Said, H. Kared, N. Grandvaux, M. R. Boulassel, J. P. Routy and P. Ancuta (2011). "Memory CCR6+CD4+ T cells are preferential targets

for productive HIV type 1 infection regardless of their expression of integrin beta7." *J Immunol* **186**(8): 4618-4630.

Perreau, M., A. L. Savoye, E. De Crignis, J. M. Corpataux, R. Cubas, E. K. Haddad, L. De Leval, C. Graziosi and G. Pantaleo (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.

Pillai, S. K., B. Good, S. K. Pond, J. K. Wong, M. C. Strain, D. D. Richman and D. M. Smith (2005). "Semen-specific genetic characteristics of human immunodeficiency virus type 1 env." *J Virol* **79**(3): 1734-1742.

Pillai, S. K., S. L. Pond, Y. Liu, B. M. Good, M. C. Strain, R. J. Ellis, S. Letendre, D. M. Smith, H. F. Gunthard, I. Grant, T. D. Marcotte, J. A. McCutchan, D. D. Richman and J. K. Wong (2006). "Genetic attributes of cerebrospinal fluid-derived HIV-1 env." *Brain* **129**(Pt 7): 1872-1883.

Planas, D., Y. Zhang, P. Monteiro, J. P. Goulet, A. Gosselin, N. Grandvaux, T. J. Hope, A. Fassati, J. P. Routy and P. Ancuta (2017). "HIV-1 selectively targets gut-homing CCR6+CD4+ T cells via mTOR-dependent mechanisms." *JCI Insight* **2**(15).

Potter, S. J., P. Lemey, G. Achaz, C. B. Chew, A. M. Vandamme, D. E. Dwyer and N. K. Saksena (2004). "HIV-1 compartmentalization in diverse leukocyte populations during antiretroviral therapy." *J Leukoc Biol* **76**(3): 562-570.

Ruffin, N., V. Brezar, D. Ayinde, C. Lefebvre, J. Schulze Zur Wiesch, J. van Lunzen, M. Bockhorn, O. Schwartz, H. Hocini, J. D. Lelievre, J. Banchereau, Y. Levy and N. Seddiki (2015). "Low SAMHD1 expression following T-cell activation and proliferation renders CD4+ T cells susceptible to HIV-1." *AIDS* **29**(5): 519-530.

Schmieder, R. and R. Edwards (2011). "Quality control and preprocessing of metagenomic datasets." *Bioinformatics* **27**(6): 863-864.

Shao, W., V. F. Boltz, J. E. Spindler, M. F. Kearney, F. Maldarelli, J. W. Mellors, C. Stewart, N. Volfovsky, A. Levitsky, R. M. Stephens and J. M. Coffin (2013). "Analysis of 454 sequencing error rate, error sources, and artifact recombination for detection of Low-frequency drug resistance mutations in HIV-1 DNA." *Retrovirology* **10**: 18.

Si-Mohamed, A., M. D. Kazatchkine, I. Heard, C. Goujon, T. Prazuck, G. Aymard, G. Cessot, Y. H. Kuo, M. C. Bernard, B. Diquet, J. E. Malkin, L. Gutmann and L. Belec (2000). "Selection of drug-resistant variants in the female genital tract of human immunodeficiency virus type 1-infected women receiving antiretroviral therapy." *J Infect Dis* **182**(1): 112-122.

Siliciano, J. D., J. Kajdas, D. Finzi, T. C. Quinn, K. Chadwick, J. B. Margolick, C. Kovacs, S. J. Gange and R. F. Siliciano (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.

Smith, D. M., S. Zarate, H. Shao, S. K. Pillai, S. L. Letendre, J. K. Wong, D. D. Richman, S. D. Frost, R. J. Ellis and H. Group (2009). "Pleocytosis is associated with disruption of HIV compartmentalization between blood and cerebral spinal fluid viral populations." *Virology* **385**(1): 204-208.

Soriano-Sarabia, N., R. E. Bateson, N. P. Dahl, A. M. Crooks, J. D. Kuruc, D. M. Margolis and N. M. Archin (2014). "Quantitation of replication-competent HIV-1 in populations of resting CD4+ T cells." *J Virol* **88**(24): 14070-14077.

Sun, H., D. Kim, X. Li, M. Kiselina, Z. Ouyang, L. Vandekerckhove, H. Shang, E. S. Rosenberg, X. G. Yu and M. Lichterfeld (2015). "Th1/17 Polarization of CD4 T Cells Supports HIV-1 Persistence during Antiretroviral Therapy." *J Virol* **89**(22): 11284-11293.

Wacleche, V. S., J. P. Goulet, A. Gosselin, P. Monteiro, H. Soudeyns, R. Fromentin, M. A. Jenabian, S. Vartanian, S. G. Deeks, N. Chomont, J. P. Routy and P. Ancuta (2016). "New insights into the heterogeneity of Th17 subsets contributing to HIV-1 persistence during antiretroviral therapy." *Retrovirology* **13**(1): 59.

Wacleche, V. S., A. Landay, J. P. Routy and P. Ancuta (2017). "The Th17 Lineage: From Barrier Surfaces Homeostasis to Autoimmunity, Cancer, and HIV-1 Pathogenesis." *Viruses* **9**(10).

Wagner, G. A., M. E. Pacold, S. L. Kosakovsky Pond, G. Caballero, A. Chaillon, A. E. Rudolph, S. R. Morris, S. J. Little, D. D. Richman and D. M. Smith (2014). "Incidence and prevalence of intrasubtype HIV-1 dual infection in at-risk men in the United States." *J Infect Dis* **209**(7): 1032-1038.

Wagner, T. A., S. McLaughlin, K. Garg, C. Y. Cheung, B. B. Larsen, S. Styrchak, H. C. Huang, P. T. Edlefsen, J. I. Mullins and L. M. Frenkel (2014). "HIV latency. Proliferation of cells with HIV integrated into cancer genes contributes to persistent infection." *Science* **345**(6196): 570-573.

Watson, S. J., M. R. Welkers, D. P. Depledge, E. Coulter, J. M. Breuer, M. D. de Jong and P. Kellam (2013). "Viral population analysis and minority-variant detection using short read next-generation sequencing." *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **368**(1614): 20120205.

Welbourn, S., S. M. Dutta, O. J. Semmes and K. Strebel (2013). "Restriction of virus infection but not catalytic dNTPase activity is regulated by phosphorylation of SAMHD1." *J Virol* **87**(21): 11516-11524.

White, T. E., A. Brandariz-Nunez, J. C. Valle-Casuso, S. Amie, L. A. Nguyen, B. Kim, M. Tuzova and F. Diaz-Griffero (2013). "The retroviral restriction ability of SAMHD1, but not its deoxynucleotide triphosphohydrolase activity, is regulated by phosphorylation." *Cell Host Microbe* **13**(4): 441-451.

Wightman, F., A. Solomon, G. Khoury, J. A. Green, L. Gray, P. R. Gorry, Y. S. Ho, N. K. Saksena, J. Hoy, S. M. Crowe, P. U. Cameron and S. R. Lewin (2010). "Both CD31(+) and CD31(-) naive CD4(+) T cells are persistent HIV type 1-infected reservoirs in individuals receiving antiretroviral therapy." *J Infect Dis* **202**(11): 1738-1748.

Wong, J. K., M. Hezareh, H. F. Gunthard, D. V. Havlir, C. C. Ignacio, C. A. Spina and D. D. Richman (1997). "Recovery of replication-competent HIV despite prolonged suppression of plasma viremia." *Science* **278**(5341): 1291-1295.

Zhang, L., L. Rowe, T. He, C. Chung, J. Yu, W. Yu, A. Talal, M. Markowitz and D. D. Ho (2002). "Compartmentalization of surface envelope glycoprotein of human immunodeficiency virus type 1 during acute and chronic infection." *J Virol* **76**(18): 9465-9473.

Zhou, S., C. Jones, P. Mieczkowski and R. Swanstrom (2015). "Primer ID Validates Template Sampling Depth and Greatly Reduces the Error Rate of Next-Generation Sequencing of HIV-1 Genomic RNA Populations." *J Virol* **89**(16): 8540-8555.

DISCUSSION

Discussion

Le premier objectif de mon projet de thèse était de caractériser d'avantage les lymphocytes T CD4⁺ mémoires SAMHD1^{low} hautement prolifératifs et activés (Ki67⁺, CD38⁺, HLA-DR⁺), précédemment décrits comme permissifs à l'infection par le VIH-1 in vitro (Ruffin, Brezar et al. 2015). Nous avons dans un premier temps approfondi le phénotype des lymphocytes T CD4⁺ SAMHD1^{low} et SAMHD1⁺ par cytométrie en flux dans le but de déterminer les proportions de cellules mémoires activées/épuisées et sénescents, étant donné leur profil hautement mature et différencié précédemment observé (Ruffin, Brezar et al. 2015).

Il a été montré qu'au cours de l'infection par le VIH-1, il existe une lymphopénie chronique et profonde qui induit une prolifération homéostatique intensive (Bell, Sparshott et al. 1987, Rocha, Dautigny et al. 1989). Cette lymphopénie est inversement corrélée au nombre de lymphocytes T CD4⁺ cycliques (Sousa, Carneiro et al. 2002, Anthony, Yoder et al. 2003). La prolifération homéostatique intensive provoque l'épuisement et / ou la sénescence des lymphocytes T avec une activité fonctionnelle compromise (Effros and Pawelec 1997). L'épuisement et la sénescence ont été décrits comme deux mécanismes importants impliqués dans le dysfonctionnement des lymphocytes T et associés au déséquilibre immunitaire dans le cadre de l'infection par le VIH-1 (Palmer, Blyveis et al. 2005, Freeman, Wherry et al. 2006, Wherry, Ha et al. 2007, Khaitan and Unutmaz 2011).

L'épuisement immunitaire est une diminution progressive de la réactivité des lymphocytes T pouvant faire suite à une exposition prolongée à l'antigène (Angelosanto, Blackburn et al. 2012). Ce phénomène d'épuisement des cellules T est accompagné de l'expression de différents marqueurs de surface qui ont été utilisés comme marqueurs d'épuisement, notamment PD-1 et 2B4 (Khaitan and Unutmaz 2011, Pombo, Wherry et al. 2015), et représente un mécanisme important de persistance virale (Zajac, Blattman et al. 1998).

Nos résultats de caractérisation phénotypique montre que les lymphocytes T CD4⁺ mémoires SAMHD1^{low} hautement prolifératifs, expriment fortement les marqueurs d'activation/épuisement CD25, PD-1 et CD95. Ces résultats vont dans le même sens que ceux de notre étude précédente décrivant les cellules SAMHD1^{low} comme étant significativement plus activées (CD38⁺, HLA-DR⁺) que les cellules SAMHD1⁺. De plus, nous avons rapporté que les cellules T_{fh} des ganglions lymphatiques, majoritairement

SAMHD1^{low} (Ruffin, Brezar et al. 2015) et principale source de cellules infectées comparé à toute autre sous-population de lymphocytes T CD4⁺, expriment fortement PD-1 (CXCR5⁺PD-1^{high}) à leur surface (Petrovas, Yamamoto et al. 2012, Perreau, Savoye et al. 2013, Xu, Weatherall et al. 2013, Kohler, Pham et al. 2016). Nos résultats sont en corrélation avec ceux obtenus par le groupe de Sekaly qui a montré en 2009 que les cellules T CD4⁺ prolifératives expriment fortement PD-1 et représentent un réservoir du virus (Chomont, El-Far et al. 2009). Par ailleurs, nous nous sommes intéressés à l'expression du marqueur CD127 (la chaîne alpha du récepteur à l'IL-7) par les cellules mémoires SAMHD1^{low}, décrit comme étant down-régulé par les cellules mémoires activées (Appay, van Lier et al. 2008). Nous révélons que les cellules CD45RO⁺ CD25⁺ SAMHD1^{low} expriment de manière plus faible ce marqueur en comparaison aux cellules mémoires SAMHD1⁺, confirmant ainsi leur caractère de cellules mémoires activées.

Dans notre étude, nous avons aussi révélé que l'expression de CD95 était significativement augmentée à la surface des cellules SAMHD1^{low}. Ces cellules ont été précédemment décrites comme étant activées (CD38⁺, HLA-DR⁺) et fortement différenciées (CCR7^{+/-}, CD27^{+/-}) (Ruffin, Brezar et al. 2015). Le CD95 est un marqueur apoptotique qui joue un rôle important dans la pathogenèse du VIH-1 (Poonia, Pauza et al. 2009), cependant, il est également régulé positivement après l'activation des lymphocytes T (Paulsen and Janssen 2011) et, par conséquent, les niveaux accrus de CD95 que nous avons trouvés sur les cellules mémoires SAMHD1^{low} pourraient être liés au statut d'activation de cette sous-population cellulaire et non pas nécessairement indicative de l'apoptose.

Dans le cadre de l'infection par le VIH-1, l'activation immunitaire et l'inflammation chronique entraînent, à terme, un épuisement des capacités du système immunitaire et son vieillissement prématuré. La sénescence du compartiment lymphocytaire T peut se mesurer dans le compartiment périphérique par un phénotype cellulaire spécifique: perte de la co-expression de CD28 (molécule de co-stimulation T essentielle) et de CD27 (molécule d'adhésion), et augmentation de l'expression de CD57 (notamment dans des conditions d'activation chronique) qui est corrélée à une prédisposition à l'apoptose (Palmer, Blyveis et al. 2005). L'infection par le VIH-1 est caractérisée par la présence d'une forte proportion de lymphocytes T sénescents (Papagno, Spina et al. 2004). Nos résultats ont montré que les cellules mémoires SAMHD1^{low} expriment faiblement les marqueurs CD27/CD28 et CD57.

Cependant, aucune différence n'a été observée dans l'expression de ces marqueurs entre les cellules mémoires SAMHD1^{low} et SAMHD1⁺. Le concept selon lequel la sénescence des cellules T survient à la suite de nombreux cycles de prolifération (Effros and Pawelec 1997) n'a pas été observé dans le cas des cellules mémoires CD45RO⁺ SAMHD1^{low}, suggérant que ces cellules ne présentent pas un profil de sénescence par rapport aux cellules SAMHD1⁺ malgré leur caractère hautement prolifératif.

Dans notre précédente étude, nous avons démontré que les lymphocytes T CD4⁺ représentaient un pool de cellules activées, différenciées et prolifératives contenant des cellules avec différentes fonctions, notamment Th17 (CCR6⁺CXCR3⁻CCR4⁺), Th1/Th17 (CCR6⁺CXCR3⁺CCR4⁻), Th1 (CCR6⁻CXCR3⁺CCR4⁻), Th2 (CCR6⁻CXCR3⁻CCR4⁺), Treg (CD127^{low}CD25^{hi}), Tfh-Like (CXCR5⁺PD-1⁺). Nous avons également révélé que les cellules mémoires SAMHD1^{low} du sang périphérique étaient enrichies en cellules CCR6⁺CXCR3⁻CCR4⁺ Th17 et étaient significativement déplétées chez les patients infectés et traités. De plus, nous avons démontré que les cellules SAMHD1^{low} étaient enrichies en Tfh (CXCR5⁺PD-1⁺Bcl6⁺) dans les ganglions lymphatiques et que ce pool de Tfh majoritairement SAMHD1^{low} était maintenu et préservé chez les patients infectés et traités en comparaison aux sujets non infectés (Ruffin, Brezar et al. 2015). Dans mon projet, nous avons confirmé que les cellules SAMHD1^{low} sont enrichies en Th17 dans le sang périphérique et significativement déplétées au cours de l'infection par le VIH-1, en utilisant une cohorte de patients VIH-1+ différente de celle utilisée dans notre étude précédente. D'autre part, nous révélons qu'en plus du sang périphérique et des ganglions lymphatiques, les lymphocytes T CD4⁺ mémoires SAMHD1^{low} sont également présents dans le tractus gastro-intestinal de sujets non infectés et de patients infectés par le VIH-1. En effet, en utilisant des biopsies rectales provenant de patients infectés, nous avons observé que de la même manière qu'en périphérie, les cellules SAMHD1^{low} sont significativement déplétées au cours de l'infection par le VIH-1 dans le tractus gastro-intestinal. De manière encore plus intéressante, nous avons observé que ces cellules étaient présentes en plus grandes proportions dans le tractus gastro-intestinal que dans le sang périphérique de patients infectés et traités. Nous n'avons malheureusement pas pu étudier de manière approfondie le phénotype des cellules SAMHD1^{low} dans les intestins comme nous l'avions fait pour le sang périphérique étant donné la rareté et faible quantité de cellules récupérées à partir des biopsies rectales. Cette partie de l'étude mériterait d'être approfondie dans des études futures.

Les cellules Th17 ont été décrites comme étant les cellules les plus susceptibles à l'infection par le VIH-1 et sont préférentiellement déplétées chez les individus infectés (El Hed, Khaitan et al. 2010, Gosselin, Monteiro et al. 2010, Monteiro, Gosselin et al. 2011, Alvarez, Tuen et al. 2013, Bernier, Cleret-Buhot et al. 2013, Gosselin, Wiche Salinas et al. 2017, Planas, Zhang et al. 2017). Récemment, deux sous-populations de cellules Th17 ont été caractérisées par le groupe d'Ancuta: co-exprimant ou non les deux récepteurs de chimiokine CXCR3 et CCR4, appelés doubles négatives (CCR6⁺DN; CXCR3⁻CCR4⁻) et doubles positives (CCR6⁺DP; CXCR3⁺CCR4⁺) (Wacleche, Goulet et al. 2016). Les cellules CCR6⁺DN expriment un profil transcriptionnel unique de développement précoce de Th17 (IL-17F, STAT3) et de Tfh (CXCR5, MYC, TERC), sont capables de proliférer en réponse à IL-2 et contiennent du VIH-1 compétent pour la réplication. De manière importante, ce groupe a montré que, contrairement aux sous-populations cellulaires classiques CCR6⁺ (Th17 et Th17Th1) qui sont déplétées chez les patients infectés, les cellules de CCR6⁺DN sont préservées (Wacleche, Goulet et al. 2016, Wacleche, Landay et al. 2017). De plus, les sous-populations CCR6⁺DN et CCR6⁺DP sont toutes les deux sensibles à l'infection par le VIH-1 in vitro et contiennent des taux relativement élevés d'ADN viral intégré chez les sujets infectés sous traitement c-ART (Wacleche, Goulet et al. 2016) et la réactivation du VIH-1 était préférentiellement observée dans les cellules CCR6⁺DN. Nous avons montré que les cellules Th17 et CCR6⁺DN, deux sous-populations cellulaires susceptibles à l'infection par le VIH-1, sont présentes dans le compartiment SAMHD1^{low}. Nous avons observé que dans ce compartiment, les cellules CCR6⁺DN étaient préservées chez les patients infectés en comparaison aux sujets non infectés (8% vs 3.8%, p<0.05), tandis que les cellules Th17 SAMHD1^{low} étaient déplétées de manière significative (41% vs 55%, p <0.05). Globalement, ces données démontrent que les cellules SAMHD1^{low} sont enrichies en cellules Th17 et CCR6⁺DN, deux cibles majeures contribuant à la persistance du VIH-1 dans le sang périphérique.

De plus, nous avons observé que, contrairement aux cellules SAMHD1^{low}, les cellules SAMHD1⁺ contiennent moins de Th17 chez les individus infectés et non infectés (respectivement 41% contre 15,4% et 55% contre 25%) et que leur déplétion au cours de l'infection était non significative. Cependant, les CCR6⁺DN étaient plus abondants dans le compartiment SAMHD1⁺ que dans le compartiment SAMHD1^{low} (25,6% vs 8% et 14,7% vs 3,8%, respectivement), suggérant que cela pourrait être conféré par l'expression élevée de

SAMHD1, ce qui est cohérent avec son rôle de facteur de restriction (Hrecka, Hao et al. 2011, Laguette, Sobhian et al. 2011, Baldauf, Pan et al. 2012, Descours, Cribier et al. 2012).

Collectivement, nous avons donc observé que les cellules SAMHD1^{low} hautement prolifératives (Ki67⁺) et différenciées (CCR7^{+/-}, CD27^{+/-}) présentent un profil d'activation (CD38⁺, HLA-DR⁺, PD-1⁺, CD25⁺, CD95⁺) et n'expriment pas de marqueurs de senescence (CD57^{low}, CD27⁻CD28⁻) en comparaison avec les cellules SAMHD1⁺. Il est difficile en l'état de savoir si ce profil d'activation est le signe d'une activation tronquée ou reflète réellement une activation spécifique de ces cellules par les CPA (cellules présentatrices d'antigènes). Une meilleure caractérisation de ces cellules SAMHD1^{low} et de leur capacité à être activées par l'antigène (CPA) pourrait permettre de répondre à cette question. De ce fait, l'identification de marqueurs membranaires propres à la population SAMHD1^{low} est cruciale pour caractériser ces cellules sur le plan fonctionnel.

Le second objectif de mon projet était de déterminer si les cellules SAMHD1^{low} contribuent à la persistance du virus et au maintien du réservoir du VIH-1 malgré les traitements c-ART, par quantification de l'ADN VIH-1 contenu dans les cellules SAMHD1⁺ et SAMHD1^{low} de donneurs infectés et traités.

Il a été montré que la persistance de cellules mémoires quiescentes à longue durée de vie représente une barrière majeure au traitement de l'infection par le VIH-1 (Chun, Finzi et al. 1995, Chun, Stuyver et al. 1997, Finzi, Hermankova et al. 1997, Wong, Hezareh et al. 1997, Finzi, Blankson et al. 1999, Siliciano, Kajdas et al. 2003, Crooks, Bateson et al. 2015). Il a également été montré qu'au cours du traitement c-ART, la fréquence des lymphocytes T CD4⁺ infectées de manière latente est associée à la fréquence de prolifération des lymphocytes T CD4⁺ mesurée par Ki67 (Chomont, El-Far et al. 2009), et que la persistance du virus est associée à la prolifération des cellules qu'elle soit homéostatique ou induites par le TCR (Soriano-Sarabia, Bateson et al. 2014, Boritz, Darko et al. 2016). La relation directe entre la prolifération des LT et la persistance du VIH-1 a été rapportée par deux études fondamentales qui ont identifié des sites spécifiques d'intégration du VIH-1 liés à l'expansion clonale des cellules infectées par le VIH-1. De plus, les intégrations de provirus ont été fréquemment trouvées dans des gènes associés aux cancers ou à la régulation du cycle cellulaire, favorisant l'infection des cellules en prolifération et la persistance des cellules

infectées en prolongeant leur survie (Maldarelli, Wu et al. 2014, Wagner, McLaughlin et al. 2014). De ce fait, la réplication virale à bas bruit conduit à l'infection continue des cellules et un renouvellement constant du réservoir viral.

En nous basant sur nos résultats précédents démontrant le profil d'activation et de prolifération des cellules SAMHD1^{low} et leur grande susceptibilité à l'infection par le VIH-1 *in vitro*, qui représentent des caractéristiques plutôt en faveur d'une infection préférentielle par le VIH-1, nous avons émis l'hypothèse que les cellules SAMHD1^{low} de patients infectés et traités, enrichies en cellules Tfh, Th17 et CCR6⁺DN, contiendraient des niveaux élevés d'ADN VIH-1 total allant de paire avec leur capacité proliférative.

Nous avons ainsi inclus dans notre étude n=36 patients infectés et bien contrôlés (cv<20 copies/ml) et nous avons détecté la présence d'ADN viral dans les deux fractions cellulaires mémoires CD45RO⁺ SAMHD1⁺ et SAMHD1^{low}, révélant ainsi que les cellules mémoires SAMHD1^{low} de patients VIH-1+ c-ART+ contiennent significativement plus d'ADN VIH-1 total (p<0.01) et 2LTR (Figure supplémentaire 1) par rapport aux cellules mémoires SAMHD1⁺. En plus des cellules T mémoires, nous avons également détecté la présence d'ADN VIH-1 dans des cellules T naïves CD45RO⁻ SAMHD1⁺ isolées du sang périphérique de patients VIH-1+ c-ART+, bien qu'à des fréquences significativement plus basses que celles détectées dans les cellules T mémoires (p<0.01). De plus, nous avons détecté la présence d'ADN VIH-1 dans les cellules naïves et mémoires SAMHD1⁺ et mémoires SAMHD1^{low} isolées du sang périphérique de patients Elite Controller (EC) à des niveaux beaucoup plus bas que ceux détectés chez les patients VIH-1+ c-ART+. Comme attendu, nous avons révélé que les cellules T naïves CD45RO⁻ SAMHD1⁺ de patients VIH-1+ c-ART+ contenaient des niveaux significativement plus élevés d'ADN VIH-1 que les cellules naïves CD45RO⁻ SAMHD1⁺ de patients EC (p<0.001). Malgré la faible fréquence d'infection et le faible pourcentage de contribution de cette sous-population cellulaire au réservoir viral total, la longue durée de vie des lymphocytes T naïfs suggère qu'ils peuvent aussi constituer un important réservoir viral chez les patients sous traitement (Michie, McLean et al. 1992, Wightman, Solomon et al. 2010). Nous n'avons pas eu l'occasion d'évaluer la quantité d'ADN virale en comparaison aux cellules SAMHD1^{low} provenant de l'intestin et des ganglions lymphatiques qui sont des cibles majeures de l'infection. Comme noté précédemment, cette étude devrait faire l'objet d'investigations supplémentaires.

Nous avons observé que les cellules SAMHD1^{low} expriment fortement le marqueur de cycle cellulaire Ki67. Cette forte expression de Ki67 par les cellules SAMHD1^{low} confirme les résultats précédents réalisés sur une autre cohorte de patients infectés et traités (Ruffin, Brezar et al. 2015). Nos résultats appuient d'avantage le concept de prolifération en tant que mécanisme de persistance virale dans les lymphocytes T CD4⁺ mémoire du sang périphérique (von Stockenstrom, Odevall et al. 2015) et nous ont permis de démontrer que les cellules SAMHD1^{low} sont une cible du VIH-1.

De manière importante, nous avons observé une corrélation significative et positive entre les niveaux d'ADN VIH-1 et l'expression de Ki-67 dans les cellules mémoires SAMHD1⁺ ($r=+0.68$, $p<0.05$), tandis qu'aucune corrélation n'a été observée entre les niveaux d'ADN VIH-1 et l'expression de Ki67 dans les cellules mémoires SAMHD1⁺ et naïves SAMHD1⁺, suggérant fortement que les cellules mémoires SAMHD1^{low} contribuent à la persistance du VIH-1. Ce résultat est en corrélation avec une étude récente où il a été montré que le VIH-1 s'intègre dans le génome de la cellule cible de manière dépendante du cycle cellulaire (Kane, Rebensburg et al. 2018). Compte tenu du profil d'activation, prolifération et différenciation (T_N, T_{CM}, T_{TM}, T_{EM}, T_{TD}) des cellules mémoires SAMHD1^{low}, de leur profil de Th17 en périphérie et de Tfh dans les ganglions lymphatiques, de leur hétérogénéité fonctionnelle (Th17, Th1/Th17, Th1, Th2, Treg, Tfh-Like), de leur dispersion et localisation dans des sites anatomiques clés et majeurs pour le réservoir viral (ganglions lymphatiques et intestins) et des niveaux d'ADN VIH-1 qu'elles renferment, nous pouvons affirmer que ces cellules mémoires SAMHD1^{low} contribuent au réservoir viral. Ces résultats suggèrent que ces cellules pourraient avoir une grande incidence sur le maintien et la persistance du virus en cours de traitement. Cependant, il ne faut pas omettre d'évoquer que nous n'avons pas mis en évidence le caractère « compétent » de la réplication du virus contenu dans nos cellules. A cette fin, il aurait fallu montrer que le virus est capable de se répliquer par réalisation d'un test de réactivation ex vivo sur fraction triée de cellules SAMHD1^{low}. Aussi, notons que l'importance de la réalisation de cette expérimentation est liée au fait que l'ADN proviral intégré englobe toutes les formes d'ADN proviral et ne définit pas la capacité de réplication du provirus comme il a été démontré dans plusieurs études transversales révélant l'existence de variétés d'ADN proviral persistant pouvant être intact ou défectueux (Ho, Shan et al. 2013, Bruner, Murray et al. 2016, Imamichi, Dewar et al. 2016, Hiener, Horsburgh et al. 2017, Lee, Orlova-Fink et al. 2017). En effet, le provirus n'est capable de se répliquer que dans une

fraction minime de lymphocytes T CD4⁺ mémoires quiescents (Chun, Finzi et al. 1995, Chun, Stuyver et al. 1997, Finzi, Hermankova et al. 1997). L'identification de marqueurs membranaires propres à la population SAMHD1^{low} est une fois de plus cruciale pour isoler ces cellules et démontrer de manière univoque la capacité (compétence) de réactivation des provirus intégrés dans le génome de ces cellules (Perreau, Savoye et al. 2013).

De manière importante, la faible expression de SAMHD1 pourrait représenter une caractéristique commune (le point commun) reliant une grande partie des sous-types cellulaires décrits jusqu'à présent comme les acteurs majeurs du réservoir viral, notamment les Tfh (Perreau, Savoye et al. 2013), Th17 (Gosselin, Monteiro et al. 2010, Sun, Kim et al. 2015), Treg (Andersson, Boasso et al. 2005), cellules activées (Margolick, Volkman et al. 1987) et les cellules mémoires (Chomont, El-Far et al. 2009).

Des études antérieures suggèrent que la prolifération homéostatique pourrait être un facteur de persistance du VIH-1 dans les cellules (Chomont, El-Far et al. 2009, Wightman, Solomon et al. 2010). Les cytokines telles que l'interleukine 7 (IL-7) et / ou l'interleukine 2 (IL-2) sont connues pour améliorer la survie et la prolifération des cellules T CD4⁺ mémoire (Geginat, Sallusto et al. 2003, Kondrack, Harbertson et al. 2003, Chomont, El-Far et al. 2009) et IL-7 induit également la prolifération de cellules infectées de manière latente sans réactivation virale ni diversification génétique (Chomont, El-Far et al. 2009, Bosque, Famiglietti et al. 2011). Le fait que les cellules SAMHD1^{low} soient hautement prolifératives nous a suggéré qu'elles pourraient être sensibles à la prolifération homéostatique induite par l'IL-7 et / ou l'IL-2. À cette fin, et pour caractériser d'avantage le phénotype d'activation et le caractère mémoire de ces cellules, nous avons évalué l'expression du CD127 et du CD25 (la chaîne alpha du récepteur IL-2) dans des cellules mémoires SAMHD1^{low} et SAMHD1⁺ ex vivo chez des patients infectés par le VIH-1 et des sujets non infectés. Nos résultats ont révélé une expression plus élevée de CD25 et plus faible de CD127 dans les cellules SAMHD1^{low} par rapport à SAMHD1⁺, excluant par conséquent le rôle de l'IL-7 dans une éventuelle prolifération homéostatique et suggérant que l'IL-2 pourrait jouer un rôle dans ce contexte. Par ailleurs, la surexpression de CD25 à la surface des cellules mémoires SAMHD1^{low} est en corrélation avec le caractère activé de ces cellules (Ruffin, Brezar et al. 2015).

Dans le but de comparer les séquences virales et déterminer l'existence d'une

compartimentation entre les virus de nos cellules d'intérêt SAMHD1^{low} et ceux des cellules SAMHD1⁺, et d'étudier les événements de migration du virus entre les sous-populations cellulaires T CD4⁺, nous avons réalisé un séquençage à haut débit du gène de l'enveloppe du VIH-1 isolé de cellules mémoires CD45RO⁺SAMHD1^{low}, mémoires CD45RO⁺ SAMHD1⁺ et naïves CD45RO⁻ SAMHD1⁺. Les analyses phylogénétiques ont révélé que les séquences virales présentaient un degré d'hétérogénéité confirmant une compartimentation des populations d'ADN VIH-1 spécifique à chacune des trois sous-populations cellulaires, chez 10 patients parmi les 12 étudiés. Les tests FST et Slatkin Maddison ont confirmé la compartimentation de l'ADN VIH-1 bien distinct dans les trois sous-populations cellulaires dans 83% des cas. La compartimentation des séquences virale entre les lymphocytes T CD4⁺ naïfs et mémoires a été décrite dans des études précédentes dans lesquelles des populations distinctes d'ADN VIH-1 avaient été observées dans divers sous-populations cellulaires, y compris les cellules mémoires (HLA-DR⁻/CD45RA⁻/CCR7^{+/-}), les lymphocytes T CD4⁺ activés (HLA-DR⁺) et naïfs (HLA-DR⁻/CD45RA⁺/CCR7⁺), les monocytes (CD3⁻/CD14⁺) et les cellules NK (CD3⁻/CD56⁺) (Fulcher, Hwangbo et al. 2004, Delobel, Sandres-Saune et al. 2005, Choi, Chaillon et al. 2016). Les populations d'ADN VIH-1 de ces divers compartiments peuvent différer entre elles par leur tropisme cellulaire, leur diversité et leurs résistances aux traitements c-ART (Si-Mohamed, Kazatchkine et al. 2000, Zhang, Rowe et al. 2002, Pillai, Pond et al. 2006). De manière importante, nous avons détecté une compartimentation robuste entre les lymphocytes mémoires SAMHD1⁺ et les lymphocytes mémoires SAMHD1^{low}, révélant à notre connaissance, pour la première fois, une compartimentation au sein de la même sous-population de cellules mémoires, définie par leur expression différentielle du facteur de restriction SAMHD1. De plus, nous avons relevé des événements de migration du virus très limités, provenant principalement de cellules naïves SAMHD1⁺ et dirigés vers les cellules mémoires SAMHD1⁺ (Figure supplémentaire 3). Chaque patient étudié présentait des degrés distincts de diversité d'ADN du VIH-1 au sein des cellules SAMHD1⁺ et SAMHD1^{low}, et de divergences (distance génétique) entre les sous-populations cellulaires (Figure supplémentaire 2). Ces résultats de divergence et de migration du virus sont cohérents avec la compartimentation très significative détectée entre les virus des cellules mémoires SAMHD1^{low}, mémoires SAMHD1⁺ et naïves SAMHD1⁺. Ces données fournissent des informations précieuses pour explorer la dynamique du VIH-1 dans le compartiment des cellules T CD4⁺ mémoire.

La taille réduite de nos échantillons limite notre capacité à généraliser ces résultats et il est possible que différentes cohortes de patients ou certains contextes de traitement produiraient des résultats différents. Il est donc impératif de souligner, et ce sur la base des analyses de compartimentation et de migration du virus que : (i) nous avons des preuves de compartimentation génétique entre les séquences des cellules naïves SAMHD1⁺, mémoires SAMHD1⁺ et mémoires SAMHD1^{low}, (ii) nous ne trouvons aucune corrélation entre la diversité/divergence et le réservoir viral dans nos échantillons de patients, nous observons très peu d'évènements de migration du virus. De plus, les méthodes que nous avons utilisées ne permettent pas de distinguer si l'ADN du VIH-1 analysé est intégré, linéaire ou circulaire. Néanmoins, comme ces patients sont sous c-ART depuis de nombreuses années, on peut supposer que la plupart de l'ADN du VIH-1 se trouve sous une forme intégrée (Mexas, Graf et al. 2012). Cependant, nous ne savons pas si les séquences analysées produiront un virus capable de se répliquer. De plus, le groupe de Siliciano a montré qu'il existait une faible corrélation entre le nombre de cellules infectées par le VIH-1 et la quantité de virus capable de se répliquer au cours d'un traitement suppressif à long terme (Eriksson, Graf et al. 2013).

Compte tenu de la taille limitée de nos échantillons et de la région du VIH-1 séquencée (boucle C2V3 du gène Env), nous ne pouvons pas exclure qu'un échange viral puisse se produire entre les sous-populations cellulaires SAMHD1⁺ et SAMHD1^{low}, avec d'autres schémas de traitement ou dans d'autres populations cellulaires. L'autre limite de mon projet est l'utilisation de la plate-forme de séquençage 454, qui est plus sujette à la recombinaison d'artefacts et aux erreurs associées aux homopolymères (Gilles, Meglec et al. 2011, Shao, Boltz et al. 2013). Néanmoins, pour surmonter cette limitation, nous avons appliqué des procédures rigoureuses de contrôle de qualité pour le séquençage à haut débit (Schmieder and Edwards 2011, Watson, Welkers et al. 2013, Chaillon, Gianella et al. 2018). Notre analyse de bioinformatique comprenait des étapes de filtration des données de qualité très strictes (Wagner, Pacold et al. 2014, Carter, Wagner et al. 2015, Fisher, Smith et al. 2015) et seules les « reads » de qualité contrôlée ont été inclus dans l'analyse (Chaillon, Nakazawa et al. 2017). De ce fait, de futures études utilisant des technologies de séquençage plus récentes et moins sujettes aux erreurs, l'utilisation de Primer ID ou de l'amplification du génome / séquençage Sanger dans différents contextes pourraient également être intéressantes (Zhou, Jones et al. 2015, Boltz, Rausch et al. 2016).

Les lymphocytes T infectés de manière latente représentent clairement un réservoir clé du VIH-1 chez les patients infectés sous traitement. La dynamique de ce réservoir et sa reconstitution continue par la réplication résiduelle ne sont pas entièrement compris et constituent un vaste domaine d'investigation. Le rôle de la prolifération homéostatique des populations de cellules T mémoires dans la persistance du virus a été révélée par des études antérieures suggérant que la prolifération cellulaire de lymphocytes T_{TM} et de lymphocytes T_N maintient le réservoir du VIH-1 chez les patients infectés sous c-ART (Chomont, El-Far et al. 2009, Wightman, Solomon et al. 2010). En supposant qu'un seul événement d'infection ait entraîné l'ensemencement de cette population de virus détectés dans les cellules SAMHD1^{low} hautement proliférative, la prolifération clonale et l'expansion de ces cellules T infectées seraient les seuls mécanismes par lesquels ces populations virales seraient détectées. Cependant, nous ne savons pas si ce virus est défectueux ou compétent pour la réplication, nous ne pouvons donc pas déterminer si la prolifération homéostatique maintient la réplication de VIH-1 compétent dans les cellules SAMHD1^{low}. Nous pourrions toutefois supposer qu'une fraction des clones plasmatiques potentiellement retrouvés après réactivation puissent provenir de cellules SAMHD1^{low} en prolifération avec du VIH-1 compétent pour la réplication, comme cela fut le cas dans l'étude du groupe de Siliciano. En effet, dans cette étude, des virus identiques à ceux des cellules T CD4⁺ quiescents ont été retrouvés dans le plasma. Cependant, chez la majorité des patients, les clones prédominants dans le plasma étaient rarement retrouvés dans les cellules T CD4⁺ quiescents (Bailey, Sedaghat et al. 2006).

Nos résultats démontrent que les cellules T CD4⁺ mémoires SAMHD1^{low}, dotées de caractéristiques uniques, représentent une cible préférentielle et importante de l'infection par le VIH-1. Cette sous-population cellulaire comprend des cellules hautement différenciées et cycliques qui renferment des niveaux élevés d'ADN VIH-1 dont les séquences sont bien séparées par une compartimentation importante entre les cellules SAMHD1⁺ et SAMHD1^{low} et une migration de virus très limitée entre les sous-populations cellulaires. À notre connaissance, notre étude est la première à révéler une telle compartimentation entre les séquences virales de cellules du même compartiment mémoire. La prochaine étape de ce projet sera de démontrer si le VIH-1 issu de ces cellules est compétent pour la réplication et l'infection d'autres cellules cibles du VIH-1. Globalement, ces données ouvrent de nouvelles voies pour la recherche et la compréhension du réservoir cellulaire.

Dans le but d'identifier des marqueurs membranaires propres aux cellules SAMHD1^{low} permettant d'étudier leurs fonctions, nous avons analysé les profils transcriptionnels de ces cellules en utilisant la plateforme de séquençage NGS. Nous avons révélé que certaines voies impliquées dans le contrôle et la progression du cycle cellulaire et la prolifération sont différenciellement activées dans les cellules mémoires SAMHD1^{low} en comparaison des cellules SAMHD1⁺. Ce résultat peut être mis en corrélation avec le profil phénotypique des cellules SAMHD1^{low} hautement prolifératives (Ki67⁺) et différenciées. Nous avons observé également dans ces cellules une inhibition considérable des voies de l'infection virale, en particulier par le VIH-1. Ce résultat suggérerait que les cellules exprimant faiblement SAMHD1, qui représentent une cible préférentielle à l'infection par le VIH-1 (Ruffin, Brezar et al. 2015), mettent en place d'autres mécanismes de protection contre l'infection. Ces mécanismes peuvent intervenir à différents stades de l'infection, notamment l'inhibition de la liaison aux rétrovirus et l'inhibition des voies d'infection par les virus à ARN dont le VIH-1. Ces données suggèrent également que des modifications de ces voies inhibitrices dans les cellules SAMHD1^{low} peuvent survenir dans le contexte de l'infection par le VIH-1, levant les processus d'inhibition de l'infection et rendant ces dernières susceptibles à l'infection (Ruffin, Brezar et al. 2015). Par ailleurs, nous avons révélé l'expression de marqueurs de mort cellulaire (Z-score= 0.39-0.51) dans les cellules SAMHD1^{low}. Ce résultat peut représenter un phénomène physiologique dans l'homéostasie du pool des cellules SAMHD1^{low} hautement prolifératives qui à long terme expriment des marqueurs de mort cellulaire afin d'être éliminées puis remplacées continuellement. Il faut néanmoins noter l'existence potentielle de biais techniques associées à ces analyses qui doivent être confirmés par d'autres expériences de cytométrie en flux pour étudier l'expression de marqueurs spécifiques de mort cellulaire (apoptose et nécrose).

Il a été démontré que l'expansion clonale et la prolifération homéostatique des cellules T infectées de manière latente suite à l'intégration du provirus dans des gènes spécifiques contribuent à la remarquable stabilité du réservoir (Finzi, Blankson et al. 1999, Wagner, McLaughlin et al. 2014). Néanmoins, étant donné l'exposition constante de la population de lymphocytes T mémoire à l'antigène spécifique et à l'activation, il a été suggéré que le VIH-1 latent réside exclusivement dans des lymphocytes T mémoire qui reconnaissent des antigènes « rares ». Une autre explication de la stabilité du réservoir pourrait être que ce dernier soit associé à un phénotype « non-sensible » des cellules T. Dans ce sens, l'étude du groupe de

Olaf Kutsch a démontré en 2015 que les cellules infectées de manière latente par le VIH-1 étaient fonctionnellement modifiées de manière compatible avec l'idée d'un phénotype « anergique » et non réactif des lymphocytes T (Seu, Sabbaj et al. 2015). Les facteurs qui ont induit ou mimé l'état d'anergie des cellules T auraient donc favorisé une infection latente par le VIH-1 révélée par une activité de la kinase favorable pour stabiliser l'infection. Cette étude démontre que des modifications stables du réseau de facteurs de transcription et de transduction du signal de cellules hôtes infectées de manière latente par le VIH-1 sont essentielles pour que le VIH-1 puisse établir et maintenir un statut d'infection latente par le VIH-1.

Nous nous sommes donc intéressés à la sensibilité des lymphocytes T CD4⁺ mémoires CD45RO⁺ SAMHD1^{low} et à leur potentiel de réponses à divers stimulation (SEB, PMA/ionomycin, monensin) ex vivo. Nous avons stimulé les cellules PBMCs provenant de sujets sains, de patients infectés et traités et de patients infectés et non traités, et nous avons étudié leur capacité à produire des cytokines (IFN γ , IL2, IL17, TNF α). Nous démontrons clairement que le compartiment cellulaire SAMHD1^{low} produit de très faibles niveaux de cytokines, comparé au compartiment SAMHD1⁺ (Figure supplémentaire. 5a, 5b). Ce résultat suggère la potentielle possibilité que ces cellules SAMHD1^{low} soient significativement « non-sensibles » comparées aux cellules mémoires SAMHD1⁺ avec une forte baisse de leur capacité à produire des cytokines. Il faut néanmoins noter l'existence de biais associée à ces expériences qui doivent être confirmés par d'autres techniques sous-mentionnées. Le potentiel caractère « anergique » des cellules mémoires SAMHD1^{low} fera l'objet de plus amples investigations.

Conclusion et perspectives

En conclusion, la fraction de cellules mémoires SAMHD1^{low} présente des caractéristiques spécifiques faisant d'elle une cible préférentielle pour le VIH-1 contribuant au maintien du réservoir viral en cours de traitement c-ART. L'identification de ces cellules comme réservoir viral amène à réfléchir à de nouvelles stratégies thérapeutiques pour limiter la taille du réservoir. Le pool de cellules mémoires SAMHD1^{low}, regroupant des acteurs majeurs du réservoir viral, notamment les Tfh, Th17 et les Treg, est facile d'accès dans le sang périphérique. Cet atout permet potentiellement d'utiliser ces cellules comme marqueur (reflet) des réservoirs cellulaires identifiés jusqu'à ce jour.

Ce travail de thèse s'est focalisé sur l'aspect phénotypique des cellules mémoires SAMHD1^{low}, leur contribution au réservoir et l'analyse des séquences virales, mais aussi sur la caractérisation sur le plan moléculaire dans le but d'identifier des marqueurs spécifiques. Néanmoins, l'aspect fonctionnel de ces cellules et la capacité de réplication du provirus intégré méritent tous deux d'être explorés et détaillés dans une prochaine étude. Tout d'abord, la caractérisation de ces cellules est à poursuivre et ces futurs travaux devront intégrer en premier lieu des expériences de validation de la liste de marqueurs membranaires révélés par l'analyse de l'expression génique ce qui permettra de trier des cellules vivantes SAMHD1^{low}.

Malgré le nombre limité de donneurs et la faible qualité des échantillons, l'analyse fonctionnelle des profils d'expression génique des cellules SAMHD1^{low} nous a permis de mettre en évidence une liste de 32 gènes dont l'expression protéique est membranaire, notamment le CD47, CD221 et CD29. Cette liste de marqueurs doit être vérifiée et validée par des techniques de cytométrie en flux et qPCR. L'identification de marqueurs membranaires propres à la population SAMHD1^{low} est cruciale pour caractériser ces cellules sur le plan fonctionnel.

En effet, l'identification de marqueurs membranaires propres aux cellules SAMHD1^{low} et le tri de cellules mémoires SAMHD1^{low} vivantes (non fixées/perméabilisées) représentera le point de départ de futures expérimentations, intégrant une quantification des ARN codant pour un large panel de molécules impliquées dans la fonction de ces cellules, notamment les cytokines sur les cellules mémoires SAMHD1^{low} (par technique luminex) ou par détection des cytokines par cytométrie en flux après activation *in vitro*, ainsi qu'une réactivation *ex vivo* des cellules SAMHD1^{low} afin de montrer les capacités de réplication du provirus.

ANNEXES

Annexe 1.

Caractéristiques physiopathologiques des patients de la cohorte VIH-1+

Characteristics of the study population								
N Pt	Gender	Age	Duration of treatment (years)	CD4	CD8	CD3	VL (copies/ml)	Nadir CD4
1	F	36	12	604	486	1097	0	137
2	M	65	23	499	518	1022	0	100
3	F	68	19	1080	469	1554	0	528
4	F	61	11	558	523	1101	0	30
5	F	57	20	398	522	979	/	135
6	M	57	7	129	789	990	/	4
7	M	41	12	490	668	1213	/	114
8	M	52	9	401	ND	ND	/	399
9	M	49	6	139	689	845	0	107
10	M	49	23	633	ND	ND	0	343
11	M	49	8	436	657	1110	0	310
12	M	45	21	522	823	1371	0	178
13	M	38	8	385	905	1329	0	220
14	F	36	14	666	1130	1839	86	193
15	M	49	23	714	417	1139	0	261
16	F	61	14	879	697	1582	0	209
17	M	53	21	418	835	1275	0	175

Tableau 1. Caractéristiques physiopathologiques de patients HIV-1⁺ c-ART⁺ inclus dans la partie « Caractérisation phénotypique des populations cellulaires dans le sang périphérique».

RB Caractéristiques physiopathologiques											
N Pt	Sexe	Age	TT	TT depuis	Durée sans TT	A la date du Prélèvement					
						CV copies/ml	CV Log	CD4 /mm ³	CD8 /mm ³	CD3 /mm ³	Nadir CD4
1	M	36,4	Traité	28/04/2005	5 ans environ	<20	<1,30	357	431	824	85
2	M	51,3	Naïf	/	6 ans au moins	63800	4,8	345	795	1170	151
3	F	27,1	Naïf	/	2 ans au moins	260	2,42	270	497	821	270
4	M	72,3	en échec sous Stribild	08/10/1999 (échec chronique)	inconnu	917	2,96	157	887	1173	52
5	M	41,9	Naïf	/	6 mois au moins	51400	4,71	800	262	1104	262
6	M	39,2	Échec thérapeutique (inobservance)	05/04/2006	6 mois au moins	29100	4,46	323	986	1355	287

Tableau 2. Caractéristiques physiopathologiques de patients HIV-1⁺ inclus dans la partie « Caractérisation phénotypique des populations cellulaires dans le tractus digestif».

Characteristics of the study population									
N Pt	Gender	Age	Duration of treatment (years)	Duration without treatment	At collection				Nadir CD4
					CD4	CD8	CD3	VL (copies/ml)	
1	M	65	4	6	471	414	892	0	319
2	M	75	18	3	657	509	1165	0	158
3	M	74	16	1	590	581	1238	0	254
4	F	45	15	0	893	1140	2018	0	212
5	F	37	1	0	431	548	991	0	210
6	F	52	16	0	1393	1009	2410	0	237
7	F	39	10	0	347	403	813	0	167
8	F	40	9	3	619	417	1036	0	137
9	M	57	19	4	621	567	1212	0	155
10	F	51	20	13	549	413	978	0	274
11	M	74	18	0	458	511	972	0	218
12	F	58	13	0	1229	1203		0	389
13	M	69	11	4	860	1257	2089	0	162
14	M	67	12	0	741	533	1306	0	156
15	M	61	34	0	311	242	579	0	179
16	M	74	17	1	500	586	1138	0	254
17	F	45	16	0	643	781	1425	0	212
18	M	69	20	8	587	575	1158	22	100
19	F	51	8	1	606	315	997	0	108
20	M	42	3	2	385	905	1329	0	220
21	F	40	7	3	604	486	1097	0	137
22	M	51	3	8	436	657	1110	0	310
23	M	49	16	1	522	823	1371	0	178
24	M	62	13	0	596	467	1057	0	174
25	F	60	21	4	774	583	1378	0	169
26	M	66	10	0	601	1125	1712	0	45
27	F	72	14	4	1080	469	1554	0	528
28	M	69	18	8	499	518	1022	0	100
29	M	60	16	6	740			0	250
30	F	65	6	0	558	523	1101	0	30
31	F	34	1	0	550	267	862	0	367
32	M	37	14	1	269	1024	1340	0	176
33	F	56	11	0	951	1124	2063	0	185
34	M	57	18	8	ND	ND	ND	ND	175
35	F	72	18	4	1357	627	2039	0	545
36	M	41	1	0	423	321	772	0	350

Tableau 3. Caractéristiques physiopathologiques de patients HIV-1⁺ c-ART⁺ inclus dans la partie « Quantification du réservoir »

Characteristics of the study population									
N Pt	Gender	Age	Date HIV+	At collection					
				CD4	CD8	CD3	VL (copies/ml)	Treatment	Nadir CD4
1	M	48	15/06/86	783	1220	2172	244	naif	332
2	F	52	15/06/86	1129	394	1548	0	naif	1106
3	F	45	15/12/90	943	675	1638	308	naif	441
4	F	33	15/09/02	737	337	1123	0	naif	687
5	F	55	15/06/85	1483	875	2520	188	naif	1110
6	M	26	03/06/13	857	994	1941	0	naif	628

Tableau 4. Caractéristiques physiopathologiques de patients EC inclus dans la partie « Quantification du réservoir ».

Annexe 2.

ARTICLE. Negative modulation of suppressive HIV-specific regulatory T cells by IL-2 adjuvanted therapeutic vaccine. [PLoS Pathog. 2017](#)

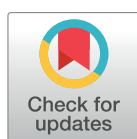
RESEARCH ARTICLE

Negative modulation of suppressive HIV-specific regulatory T cells by IL-2 adjuvanted therapeutic vaccine

Vedran Brezar^{1,2,3}, Lylia Hani^{1,2,3}, Mathieu Surenaud^{1,2,3}, Audrey Hubert^{1,2,3}, Christine Lacabaratz^{1,2,3}, Jean-Daniel Lelièvre^{1,2,3,4}, Yves Levy^{1,2,3,4*}, Nabila Seddiki^{1,2,3*}

1 Inserm, U955, Equipe 16, Créteil, Paris, France, **2** Université Paris Est, Faculté de médecine, Créteil, Paris, France, **3** Vaccine Research Institute (VRI), Créteil, Paris, France, **4** AP-HP, Hôpital H. Mondor - A. Chenevier, Service d'immunologie clinique et maladies infectieuses, Créteil, Paris, France

* nabila.seddiki@inserm.fr (NS); yves.levy@aph.fr (YL)



Abstract

The potential benefit in using IL-2 in immunotherapy for cancer and autoimmunity has been linked to the modulation of immune responses, which partly relies on a direct effect on Tregs populations. Here, we revisited the role of IL-2 in HIV infection and investigated whether its use as an adjuvant with therapeutic vaccination, impacts on HIV-specific responses. Anti-retroviral therapy treated-patients were randomized to receive 4 boosts of vaccination (ALVACHIV/Lipo-6T, weeks 0/4/8/12) followed by 3 cycles of IL-2 (weeks 16/24/32) before treatment interruption (TI) at week40. IL-2 administration increased significantly HIV-specific CD4⁺CD25⁺CD134⁺ T-cell responses, which inversely correlated with viral load after TI ($r = -0.7$, $p < 0.007$) in the vaccine/IL-2 group. IL-2 increased global CD25⁺CD127^{low}FoxP3⁺Tregs ($p < 0.05$) while it decreased HIV- but not CMV- specific CD39⁺FoxP3⁺CD25⁺CD134⁺Tregs ($p < 0.05$). HIV-specific Tregs were inversely correlated with IFN- γ producing specific-effectors ($p = 0.03$) and positively correlated with viral load ($r = 0.7$, $p = 0.01$), revealing their undesired presence during chronic infection. Global Tregs, but not HIV-specific Tregs, inversely correlated with a decrease in exhausted PD1⁺CD95⁺ T-cells ($p = 0.001$). Altogether, our results underline the negative impact of HIV-specific Tregs on HIV-specific effectors and reveal the beneficial use of IL-2 as an adjuvant as its administration increases global Tregs that impact on T-cell exhaustion and decreases HIV-specific CD39⁺Tregs by shifting the balance towards effectors.

OPEN ACCESS

Citation: Brezar V, Hani L, Surenaud M, Hubert A, Lacabaratz C, Lelièvre J-D, et al. (2017) Negative modulation of suppressive HIV-specific regulatory T cells by IL-2 adjuvanted therapeutic vaccine. *PLoS Pathog* 13(7): e1006489. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006489>

Editor: Guido Silvestri, Emory University, UNITED STATES

Received: March 8, 2017

Accepted: June 23, 2017

Published: July 14, 2017

Copyright: © 2017 Brezar et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: This study was supported by the Investissement d'Avenir program managed by the ANR under reference ANR-10-LABX-77 and by the Agence Nationale pour la Recherche sur le SIDA et les hépatites virales (ANRS), the Vaccine Research Institute (VRI). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Author summary

Interleukin-2 (IL-2) has been used in immunotherapy for cancer and autoimmunity and its beneficial effect has been linked to the modulation of immune responses, which partly relies on a direct effect on Tregs populations. In this study, we assessed the role of IL-2 in HIV infection and investigated whether its use as an adjuvant with therapeutic vaccination, impacts on HIV-specific responses. We show that IL-2 administration increased HIV-specific CD4⁺CD25⁺CD134⁺ T-cell responses which inversely correlated with viral

Competing interests: The authors have declared that no competing interests exist.

load after treatment interruption in the vaccine/IL-2 group. We also show that IL-2 increased global CD25⁺CD127^{low}FoxP3⁺Tregs while it decreased HIV- but not CMV-specific CD39⁺FoxP3⁺CD25⁺CD134⁺Tregs. Moreover, we show that HIV-specific Tregs were inversely correlated with IFN- γ -producing specific-effectors and positively correlated with viral load. Moreover, we show that global Tregs, but not HIV-specific Tregs, inversely correlated with a decrease in exhausted PD1⁺CD95⁺ T-cells. Altogether, our results underline the negative impact of HIV-specific Tregs on HIV-specific effectors and reveal the beneficial use of IL-2 as an adjuvant as its administration increases global Tregs that impact on T-cell exhaustion and decreases HIV-specific CD39⁺Tregs by shifting the balance towards effectors.

Introduction

CD4⁺ regulatory T cells (Tregs) are central in maintaining peripheral tolerance and constitute the most important extrinsic inhibitory mechanism that control T-cell responses (reviewed in [1]). Human peripheral thymic-derived naive and effector Tregs are delineated as CD4⁺CD25^{hi}CD127^{low}FoxP3⁺CD45RA⁺ and CD45RA⁻ respectively [2–4], while circulating antigen-specific Tregs, best at regulating targeted immune responses, can be identified by the expression of co-stimulatory molecules such as CD134 (OX40) [5,6] or CD137 (4-1BB) [7,8]. We have recently shown in a therapeutic vaccine study, that vaccinees who displayed lower levels of HIV-specific CD4⁺CD134⁺CD25⁺CD39⁺FoxP3⁺ Tregs showed better responses to the vaccine even though global CD4⁺CD25^{hi}CD127^{low}FoxP3⁺ were slightly increased, probably reflecting restoration of CD4⁺ T-cell compartment [9]. However, Tregs subsets dynamics and the particular role played by each subset during chronic infection are still unclear.

Targeting Tregs subsets to shift the balance between tolerance and immunity in the clinic remains challenging. To this end, the use of recombinant interleukin 2 (rIL-2) has been beneficial as several successes of low-dose rIL-2 therapy in animal models of autoimmune pathology [10–14] and human clinical studies in hepatitis C virus induced vasculitis, chronic graft-versus-host disease (GVHD), Type1 Diabetes (T1D), systemic lupus erythematosus (SLE), and Alopecia areata [15–21] have been reported. These successes led to other clinical trial studies, including rheumatoid arthritis, ankylosing spondylitis, psoriasis, Behcet’s disease, Crohn’s disease and ulcerative colitis (TRANSREG, clinicalTrials.gov NCT01988506). The advantageous function of low-dose rIL-2 in this context has been linked to the expansion of Tregs that play a major role in controlling immune responses and establishing tolerance [22].

In cancer immunotherapy, high-dose intermittent rIL-2 therapy has increased long-term survival for some patients with metastatic renal cell carcinoma [23] and rIL-2 therapy alone or in combination with a peptide vaccine has resulted in clinical improvement for patients with metastatic melanoma [24,25]. However, the use of rIL-2 to enhance immune restoration in infectious diseases such as in human immunodeficiency virus (HIV-1) infection did not have similar success. Indeed, two major clinical trial studies, SILCAAT and ESPRIT, have been conducted to expand the CD4⁺ T-cell pool in HIV-1-infected patients and despite a substantial and sustained increase in the CD4 count as compared with antiretroviral therapy (HAART) alone, rIL-2 plus HAART yielded no clinical benefit [26]. These disappointing results were explained by the expansion of two distinct CD4⁺CD25⁺ T-cell populations CD4⁺CD25^{low}CD127^{low}FoxP3⁺ and CD4⁺CD25^{hi}CD127^{low}FoxP3^{hi} with gene expression profiles similar to those of CD4⁺CD25^{hi}FoxP3⁺ Tregs [27]. However, when continuous IL-2 administration has been used as an adjuvant along with therapeutic vaccination and antiretroviral treatment, in

simian immunodeficiency virus (SIV) infected macaques, the results showed increased SIV-specific CD8 T-cell responses and resulted in decreased viral load (VL) [28,29]. In humans, greater improvement was seen in one trial (ANRS 093), where patients were randomized to continue either HAART alone or to receive therapeutic vaccines (ALVAC-HIV and Lipo-6T) followed by 3 cycles of subcutaneous IL-2 [30,31]. The results showed that therapeutic immunization combining ALVAC-HIV and Lipo-6T vaccines followed by IL-2 administration, induced sustained and broad CD4 T-cell immune responses to HIV antigens in chronically HIV-infected patients, that correlated with a partial control of viral replication following treatment interruption (TI) [30,31].

In this ANRS 093 follow-up study, we aimed to comprehensively analyse changes in the phenotype and function of Tregs subsets and hypothesized that by using IL-2 as an adjuvant along with therapeutic vaccination, we may affect distinctively peripheral global CD4⁺ CD25^{hi} CD127^{low} FoxP3⁺ and HIV-specific CD4⁺ CD134⁺ CD25⁺ CD39⁺ FoxP3⁺ Tregs. We show that therapeutic vaccine associated to IL-2 adjuvant increases global Tregs that impacts on T-cell exhaustion and decreases HIV-specific Tregs thus shifting the balance towards effectors.

Results

Therapeutic immunization strategy

This clinical trial is part of the ANRS 093 randomized study. As detailed in the methods section and summarized in Fig 1, HAART treated chronic HIV-infected subjects received two different vaccines: four shots of recombinant ALVAC-HIV (vCP1433) and HIV LIPO-6T (HIV-1 lipopeptides + TT) or placebo every four weeks, followed by administration of three cycles of subcutaneous IL-2 at 4.5MIU (two injections a day for five days). Cells from 26

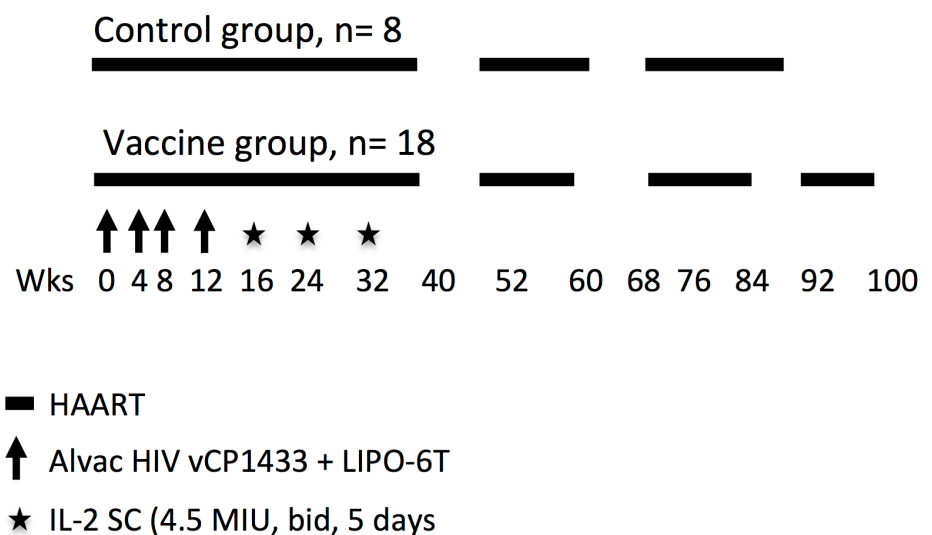


Fig 1. Therapeutic immunization strategy. HAART treated chronic HIV-infected subjects received two vaccines: recombinant ALVAC-HIV (vCP1433) and Lipo-6T (HIV-1 lipopeptides), followed by administration of three cycles of subcutaneous IL-2. Patients received a schedule of four shots of vaccine or placebo, every four weeks followed by three cycles of IL-2 at 4.5MIU (two injections a day for five days). Eight weeks after the last IL-2 cycle, HAART was stopped and patients' viral load measured. The treatment was reintroduced only if viral load was over 50,000 copies/ml at one measurement or over 10,000 copies/ml at two consecutive measurements.

<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006489.g001>

Table 1. Patients' characteristics.

	Placebo (n = 8)	VAC-IL2 (n = 18)	P value ^a
Sexe	5M, 3F	14M, 4F	
Median age (years) [IQR]	38 [35–39]	41 [35–45]	
HIV RNA pre HAART (copies/ml) [IQR]	9850 [919–19243]	14658 [7185–59745]	0.0017
HIV RNA <50 copies/ml at baseline (No/total No)	8/8	17/18	
Median CD8 cell count at baseline (/mm ³) [IQR]	885 [615–1168]	731 [514–964]	0.146
Median CD4 cell count at baseline (/mm ³) [IQR]	944 [658–1095]	638 [511–778]	0.458
Median Nadir CD4 [IQR]	303 [197–318]	249 [208–286]	0.749
HIV RNA <50 copies/ml at W36 (No/total No)	7/8	18/18	
Median CD8 cell count at W36 (/mm ³) [IQR]	1015 [790–1130]	898 [686–1137]	0.016
Median CD4 cell count at W36 (/mm ³) [IQR]	1032 [815–1221]	1145 [721–1313]	0.96
Stop HAART at W40 (No/total No)	7/8	18/18	
virological success at W52(No/total No) ^b	1/7	8/18	
Median time to virological failure (days) [IQR]	29 [28–53]	72 [28–86]	0.652
Median peak HIV RNA (copies/ml) [IQR]	183000 [50250–698090]	40250 [18904–140930]	<0.001
Median time to peak HIV RNA (days) [IQR]	28 [24–39]	42 [28–56]	0.07

IQR, interquartile range; Vac-IL-2, ALVAC-HIV (vCP1433) and Lipo-6T vaccines plus interleukin-2

^aFisher test, Wilcoxon rank-sum test, log-rank test for the time variables (one-sided tests).

^bPatients were considered as in virological success if they stopped antiviral drugs at week 40 and remained off therapy and with plasma HIV RNA values <50.000 copies/ml at week 44 and <10.000 copies/ml at week 48 thereafter until week 52

<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006489.t001>

patients (n = 8 placebo and n = 18 vaccine/IL2) were available amongst the 70 patients included in the ANRS 093 trial. In this study, we focused our analyses on vaccine/IL-2 group patients (n = 18) before (wk0) and after vaccine (wk16) and IL-2 treatment (wk36). Placebo group has not been included in our analyses, apart from Table 1 where vaccine/IL-2 group characteristics were compared to the placebo group. As summarized in the table, patients from both groups showed no difference in CD8 and CD4 cell counts and in nadir CD4 at randomization. Plasma HIV-1 VL (copies RNA/ml) before HAART was higher in the vaccine group. After vaccination (wk36), all but 1 in placebo group had undetectable plasma HIV-1 VL and CD8 cell count was lower in vaccine group. After treatment interruption (wk40), HIV-1 RNA peak was significantly lower in the vaccine group, and a trend towards a longer time to viral peak rebound was observed in the vaccine group as compared to the placebo group (Table 1).

Subcutaneous injections of IL-2 expand peripheral CD4⁺CD25⁺CD127^{low}FoxP3⁺ naïve and total memory Tregs

In order to assess the impact of vaccination and IL-2 therapy on Tregs expansion, we measured the frequency of three subsets of Tregs in patients at wk0, wk16 and wk36, namely: naïve CD4⁺ CD45RO⁻ CD25⁺ CD127^{low} FoxP3⁺, total memory CD4⁺ CD45RO⁺ CD25⁺ CD127^{low} FoxP3⁺ and memory CD4⁺ CD45RO⁺ CD25⁺ CD127^{low} FoxP3⁺ CD39⁺ as shown in the gating strategy (Fig 2A). The 3 subsets have been identified and their proportions measured in eighteen patients (Table 1). Each patient can be distinguished in the figures by a colored symbol.

The results show that while no changes were observed between wk0 and wk16 (Fig 2), proportions of total Tregs and among them both naïve CD45RO⁻ CD25⁺CD127^{low}FoxP3⁺ and total memory CD45RO⁺ CD25⁺CD127^{low}FoxP3⁺ Tregs, significantly increased at wk36 compared to wk0 (mean ±SEM for naïve Tregs: 4.8% ±1.1 vs 20.8% ±2.1, p<0.0001 and total

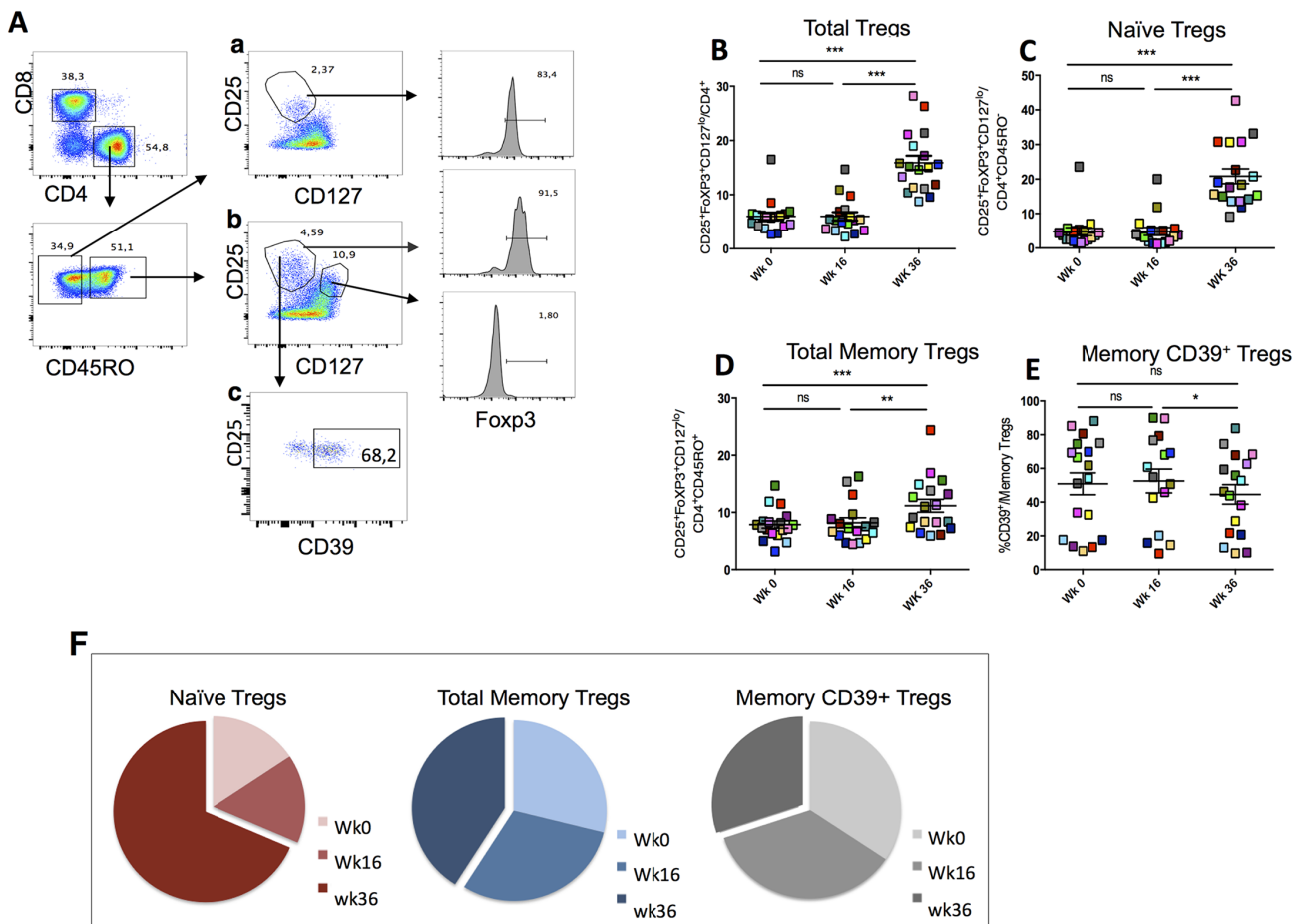


Fig 2. Subcutaneous injections of IL-2 expand peripheral CD4⁺CD25⁺CD127^{low}Foxp3⁺ naïve and total memory Tregs. (A) Gating strategy for naïve CD4⁺ CD45RO⁻ CD25⁺ CD127^{low} FoxP3⁺, total memory CD4⁺ CD45RO⁺ CD25⁺ CD127^{low} FoxP3⁺ and memory CD4⁺ CD45RO⁺ CD25⁺ CD127^{low} FoxP3⁺ CD39⁺. (B) Proportions of total CD4⁺CD25⁺CD127^{low}Foxp3⁺ Tregs, (C) naïve CD45RO⁻CD4⁺CD25⁺CD127^{low}Foxp3⁺ Tregs, (D) total memory CD45RO⁺CD4⁺CD25⁺CD127^{low}Foxp3⁺ Tregs and (E) memory CD39⁺Tregs, were measured in eighteen patients at wk0, wk16 and wk36 after vaccination and IL-2 injections. Each patient can be distinguished by a colored symbol in the figures. (F) Pie chart showing comparison for compartments of Tregs subsets expansion at wk0, wk16 and wk36. Prism 5.0, version 5.0d, (GraphPad Software, Inc.) was used for statistical analyses. P values were considered significant when < 0.05.

<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006489.g002>

memory Tregs: 8.2% ±0.8 vs 11.2% ±1.1, p<0.01; (panel C and D, Fig 2)), demonstrating the direct effect of IL-2 on both IL-2 receptor α-chain-expressing cell subsets (Fig 2B–2D). The only exception was the memory CD39⁺ subset among total memory Tregs that decreased after IL-2 administration (mean ±SEM of 52.5% ±7.06 vs 44.5% ±5.7, p<0.05; Fig 2E). The comparison in Tregs expansion at wk36 after IL-2 treatment highlights the significant expansion of the naïve Tregs compartment compared to the others (Fig 2F).

Subcutaneous injections of IL-2 decrease PD-1 expression in CD4⁺ and CD8⁺ T cells

Given that T-cell activation and exhaustion are two major features of chronic viral infections [32], we assessed these two characteristics using patients' CD4⁺ and CD8⁺ T-cells at wk0, wk16

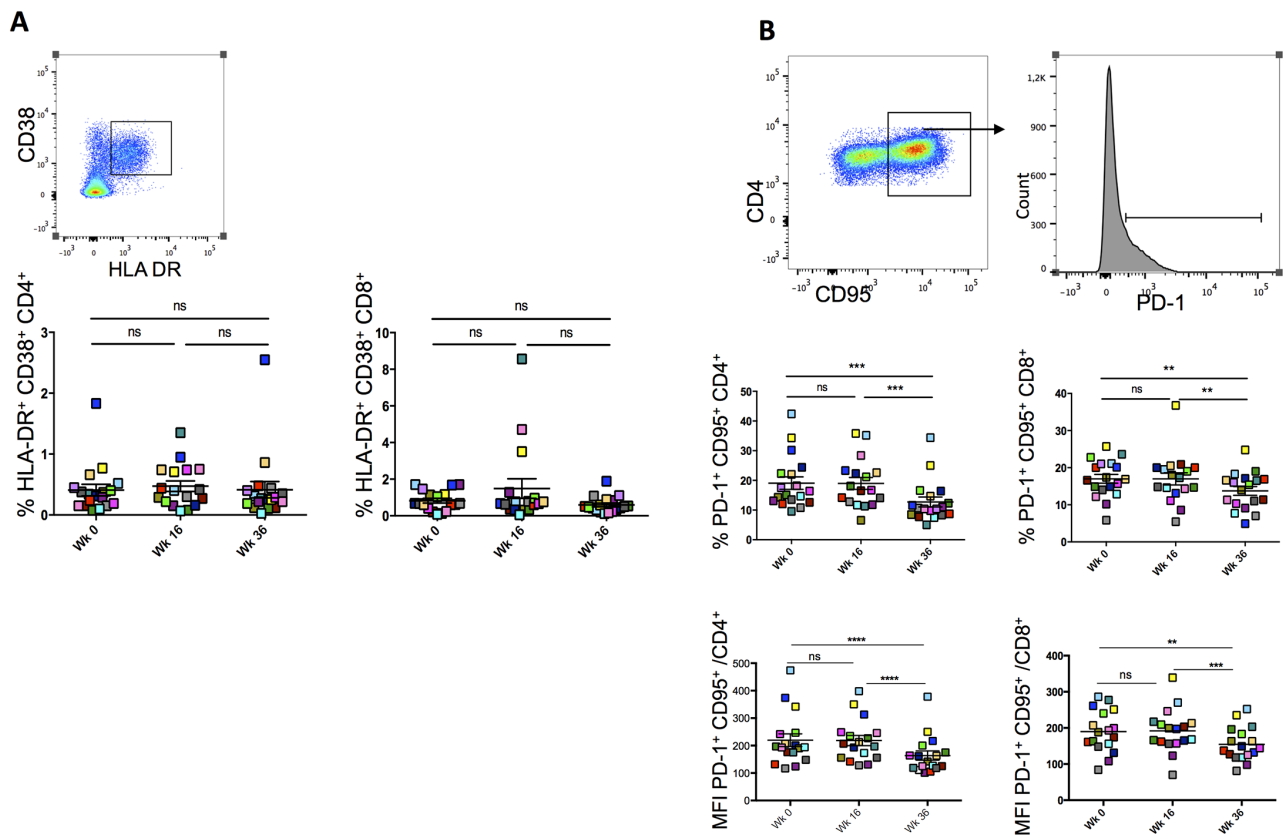


Fig 3. Subcutaneous injections of IL-2 decrease PD-1 expression in CD4+ and CD8+ T cells. (A) Gating strategy for CD4+ HLA-DR⁺CD38⁺ and CD8+ HLA-DR⁺CD38⁺ cell frequencies measured at wk0, wk16 and wk36. Cells were first gated on CD3+CD4+ before depicting CD38+HLA-DR+ subset. (B) Gating strategy for CD4⁺CD95⁺PD-1⁺ and CD8⁺CD95⁺PD-1⁺ cell frequencies that were measured at wk0, wk16 and wk36. CD3⁺CD4⁺ cells were first selected, then CD95⁺ cell gate applied and finally PD-1⁺ cells were depicted. Bottom panel shows Mean Fluorescence Intensity (MFI) for PD-1 on CD95⁺CD4⁺ and CD95⁺CD8⁺. Prism 5.0, version 5.0d, (GraphPad Software, Inc.) was used for statistical analyses. P values were considered significant when < 0.05.

<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006489.g003>

and w36. The expression of HLA-DR and CD38 molecules together with inhibitory receptors PD-1, Tim-3, 2B4 and Blimp-1 that have been shown to play a central role in inhibiting T-cell function during chronic infections, were measured [33].

CD4⁺ and CD8⁺ HLA-DR⁺CD38⁺ cell frequencies were not affected by neither vaccine nor IL-2 administration as there were no changes in their frequencies at the three time points ($p > 0.05$, Fig 3A) IL-2 treatment led to a significant decrease in CD4⁺CD95⁺PD-1⁺ and CD8⁺CD95⁺PD-1⁺ frequencies ($19\% \pm 2$ vs $12.7\% \pm 1.6$, $p < 0.0001$ and $17.1\% \pm 1.6$ vs $13.7\% \pm 1.1$ in CD4 and CD8 subsets at wk16 and wk36 respectively, $p < 0.001$; Fig 3B). Similar results were observed with PD-1 mean fluorescence intensity (MFI) on both CD4⁺CD95⁺ and CD8⁺CD95⁺ T cells (Fig 3C). Tim-3 and Blimp-1 MFI followed similar trends ($p < 0.05$; S1 Fig). Moreover, we observed a decrease in CD38 and HLA-DR MFI at wk36 on CD4⁺CD95⁺ cells (S1 Fig). Of note there was an inverse correlation, although not significant, between total memory CD45RO⁺CD25⁺CD127^{low}FoxP3⁺ ($p = 0.05$) but not naïve CD45RO⁻CD25⁺CD127^{low}FoxP3⁺ Tregs ($p > 0.05$) with CD95⁺PD1⁺ CD4⁺ T cell frequencies at wk36 (Fig 4A and 4B) suggesting

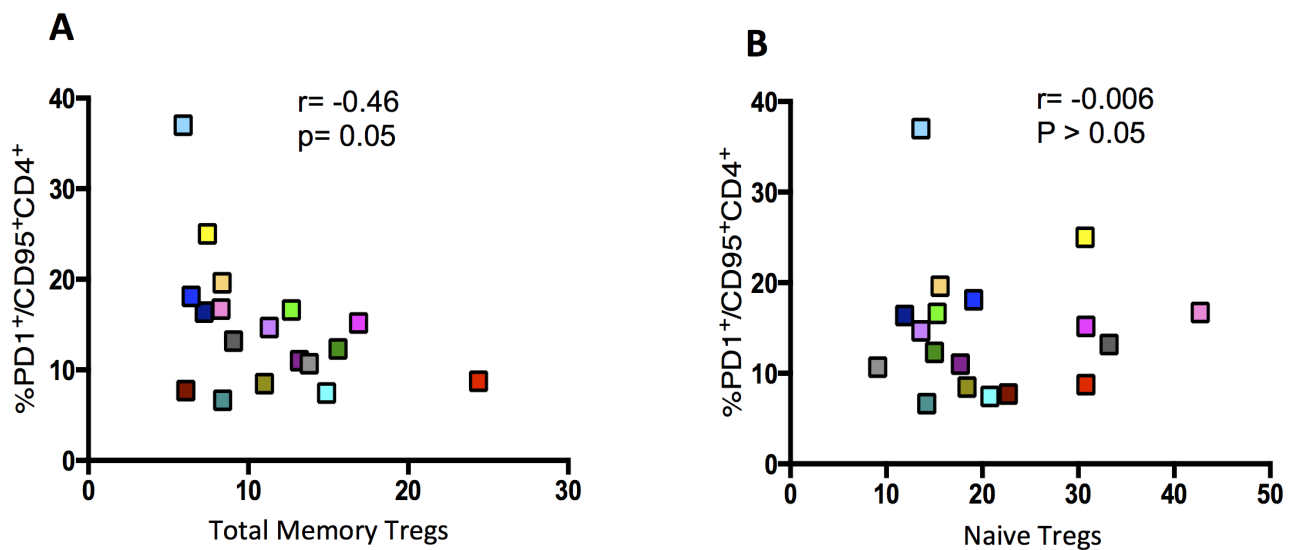


Fig 4. Correlation between total memory or naive Tregs with PD1⁺ CD95⁺ cells. At week 36% total memory CD45RO⁺CD25⁺CD127^{low}FoxP3⁺ (A) or naive CD45RO⁻CD25⁺CD127^{low}FoxP3⁺ (B) were measured by flow cytometry and then correlated with %PD-1⁺CD95⁺CD4⁺. Correlations were calculated using spearman correlation coefficients (Prism 5.0, version 5.0d). P values were considered significant when < 0.05.

<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006489.g004>

that these Tregs may impact on T-cell exhaustion. However, further experiments are needed to assess the role of CD45RO⁺CD25⁺CD127^{low}FoxP3⁺ Tregs in the control of T-cell exhaustion.

HIV-specific CD4⁺ T-cell responses were amplified by IL-2 treatment and inversely correlated with VL after treatment interruption

We have recently shown that CD4⁺CD25⁺CD134⁺ HIV-specific responses induced after vaccination, inversely correlated with viral load rebound after TI [9]. To investigate whether the same applied in ANRS 093 clinical trial where a different vaccine was given, we measured CD4⁺ Gag-specific responses at wk0, wk16 and wk36 using the “OX40 assay” (reviewed in [1]). We observed a significant increase in HIV-specific responses only after IL-2 treatment (wk36) (wk16 vs wk36 $p < 0.02$ and wk0 vs wk36 $p < 0.008$, Fig 5B). This induction was antigen-dependent as only HIV-specific but not CMV-specific responses were affected (Fig 5B and 5D). In line with our previous findings, the HIV-specific responses (at wk36) inversely correlated with viral load after treatment interruption ($r = -0.7$ and $p < 0.007$; Fig 5C), but this was not the case for CMV-specific responses, which did not show any correlation with HIV viral load after treatment interruption (Fig 5E). Of note, we did not see any changes in CD4⁺CD25⁺CD134⁺ HIV-specific responses in HIV-infected patients placebo group who did not receive the vaccine and IL-2 therapy.

Negative modulation of HIV-specific Tregs by IL-2 therapy

Results described above showed that IL-2 therapy down-modulated a population of Tregs expressing CD39⁺. We have previously shown that by using CD39 and FoxP3 we were able to delineate two populations of antigen-specific CD4⁺CD25⁺CD134⁺ T cells with different origin and function, namely Tregs and Teffs (Fig 6A) and [6,9] and that CD39⁺ Tregs are potent suppressors of HIV-specific responses in both natural infection and vaccination [9,34]. Accordingly, we confirm here that frequency of CD39⁺FoxP3⁺CD25⁺CD134⁺ HIV-specific Tregs was

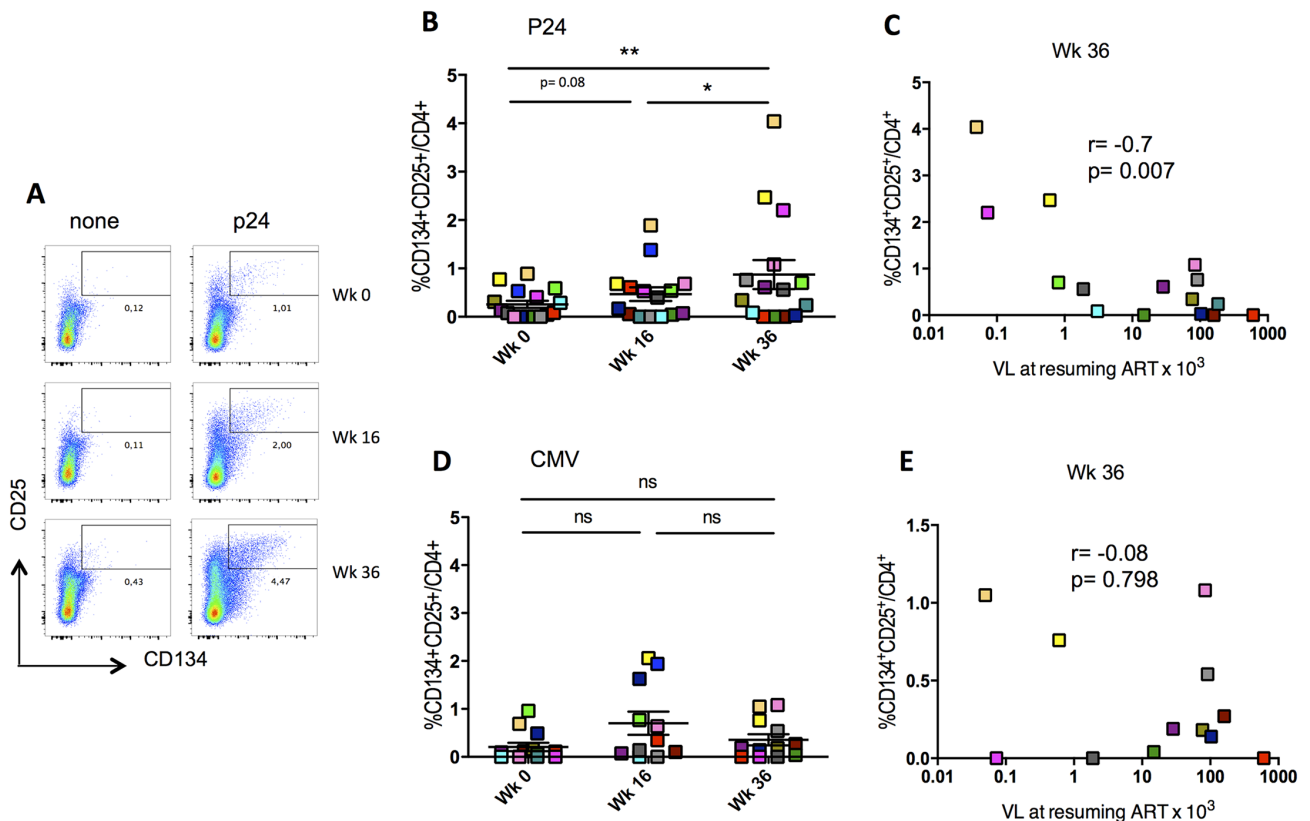


Fig 5. HIV-specific CD4⁺ T-cell responses were amplified by IL-2 treatment and inversely correlate with VL after treatment interruption. (A) Example of gating strategy used for detecting antigen-specific CD4⁺CD25⁺CD134⁺ cells after in vitro stimulation with p24 or none (OX40 assay), at wk0, wk16 and wk36. (B and D) Representation of HIV- and CMV- specific CD4⁺CD25⁺CD134⁺ percentages in patients at wk0, wk16 and wk36 using the gating strategy shown in (A). (C and E) Correlations between %CD4⁺CD25⁺CD134⁺ and viral load at resuming ART, at wk36 for p24 and CMV, respectively. Correlations were calculated using spearman correlation coefficients (Prism 5.0, version 5.0d). P values were considered significant when < 0.05.

<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006489.g005>

positively correlated with VL after TI ($r = 0.7$ and $p = 0.01$; Fig 6C) and interestingly IL-2 therapy decreased significantly the frequency of CD39⁺FoxP3⁺CD25⁺CD134⁺ HIV-specific Tregs, but not CMV-specific Tregs ($p = 0.01$, Fig 6B). We also found that frequency of CD39⁺FoxP3⁺CD25⁺CD134⁺ HIV-specific Tregs was inversely correlated with IFN- γ producing effector specific cells that were measured by ELISpot ($r = -0.7$, $p = 0.03$; Fig 7)

To describe more thoroughly the phenotype of these cells, we assessed the expression of several putative Tregs markers, such as Helios, CTLA-4 and CD15s, which has recently been reported as a novel marker of highly suppressive Tregs [35]. Our results show that these markers were more abundantly expressed on CD39⁺FoxP3⁺CD25⁺CD134⁺ in comparison to both CD39⁻FoxP3⁺ and CD39⁻FoxP3⁻CD25⁺CD134⁺ cells as represented by the mean fluorescence intensity (MFI) for each molecule (Fig 8B). ICOS expression was similar in all subsets but Tbet and PD-1 expressions were higher in CD39⁻FoxP3⁻ as compared to the other subsets. Similar data were obtained with HIV-specific CD39⁺FoxP3⁺ cells from patients, with CTLA-4 being significantly higher on these cells (S2 Fig). Of note, MFI of CTLA-4, Helios, CD15s molecules remained stable on HIV-specific Tregs at wk0, wk16 and wk36 (S2 Fig). In addition to the phenotype, we have also assessed the suppressive capacity of CD39⁺Tregs by measuring

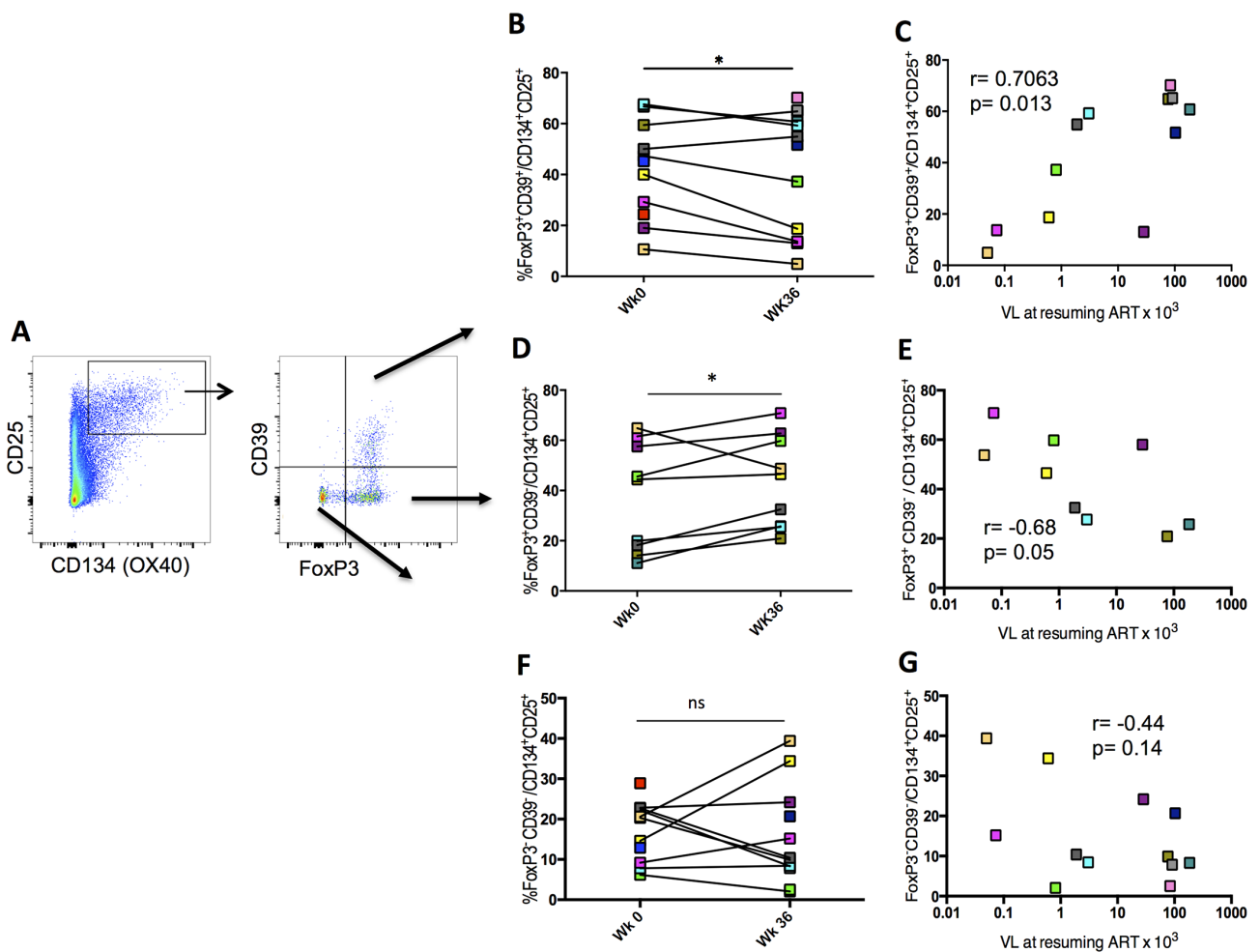


Fig 6. HIV-specific Tregs decrease after IL-2 treatment and positively correlate with viral load after treatment interruption. (A) Gating strategy used for detecting HIV-specific CD4⁺CD25⁺CD134⁺CD39⁺FoxP3⁺ Tregs after p24 stimulation using the “OX40 assay”. (B, D and F) HIV-specific CD4⁺CD25⁺CD134⁺CD39⁺FoxP3⁺ Tregs percentages in patients at wk0 and wk36 using the gating strategy shown in (A). (C, E and G) Correlations between %CD4⁺CD25⁺CD134⁺CD39⁺FoxP3⁺ Tregs at wk36 and viral load at resuming ART. Correlations were calculated using spearman correlation coefficients (Prism 5.0, version 5.0d). P values were considered significant when < 0.05.

<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006489.g006>

cytokine production (TNF- α or IFN- γ) by flow cytometry (using the OX40 assay) and by ELI-Spot, before and after CD39⁺CD4⁺ cell depletion. In S3 Fig we show a representative flow cytometry experiment (1 out of 5 that have been performed on 3 HIV⁺ and 2 CMV⁺ individuals) where total PBMCs or CD39⁺CD4⁺-depleted PBMCs have been stimulated by either CMV, gag-p24 or SEB. As indicated in the figure, the frequency of total CD134⁺CD25⁺CD4⁺ CMV-specific cells decreased from 3.62% to 1.44% (before and after depletion, respectively) and within this subset, there was a significant decrease in CD39⁺Foxp3⁺ cells (30.3% vs 3.66% before and after depletion respectively), which demonstrates depletion efficacy (S3 Fig). Importantly, we observed an increase of about 25–30% in TNF- α production ($p < 0.05$) after CD39⁺CD4⁺ depletion in CD134⁺CD25⁺CD4⁺ CMV- (mean \pm SEM, 6.55 \pm 0.44% vs 9.92 \pm 2.78%) and HIV- (mean \pm SEM, 6.2 \pm 3% vs 8.1 \pm 3.7%) specific cells, demonstrating that CD39⁺Tregs have a suppressive function and are able to inhibit cytokine production. Similar

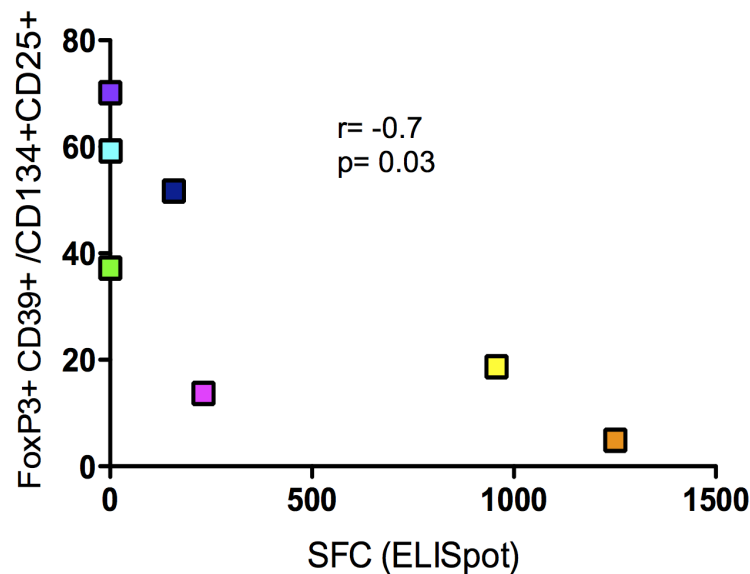


Fig 7. Correlations between %CD4⁺CD25⁺CD134⁺CD39⁺FoxP3⁺ Tregs and p24 IFN γ -ELISpot at wk36. IFN- γ producing cells (SFC) were measured by ELISpot as described in the methods. Correlations were calculated using spearman correlation coefficients (Prism 5.0, version 5.0d). P values were considered significant when < 0.05.

<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006489.g007>

trends were obtained when we performed IFN- γ ELISpot experiments using total PBMCs and CD39⁺CD4⁻-depleted PBMCs stimulated with p24 15-mer peptide pool (S3 Fig).

Altogether, these data indicate that antigen-specific CD39⁺FoxP3⁺CD25⁺CD134⁺ cells display bona fide Tregs characteristics.

Globally, these results underline the negative impact of HIV-specific Tregs on HIV-specific effector responses and on the control of HIV replication and reveal the effect of IL-2 decreasing a population of HIV-specific Tregs expressing CD39.

At the same time, we observed after IL-2 therapy a trend for an increase in CD39⁺FoxP3⁻CD25⁺CD134⁺ effector cell frequency at wk36 compared to wk0 (Fig 6F). Moreover, an inversed correlation with VL was observed but was not statistically significant (Fig 6G). In contrast, the fraction of CD25⁺CD134⁺ HIV-specific cells T cells expressing FoxP3 but not CD39 (CD39⁻FoxP3⁺CD25⁺CD134⁺) increased at wk36 ($p < 0.05$; Fig 6D) and showed an inverse correlation with VL ($r = -0.7$ and $p = 0.05$; Fig 6E).

Contrary to CD45RO⁻CD25⁺CD127^{low}FoxP3⁺ Tregs, CD39⁺FoxP3⁺CD25⁺CD134⁺ HIV-specific Tregs did not show an inverse correlation with CD95⁺PD1⁺ CD4⁺ T cells (S4 Fig) suggesting that they do not impact on T-cell exhaustion.

Discussion

Lessons from the previous phase III trials (SILCAAT and ESPRIT) that have been conducted to expand the CD4⁺ T-cell pool in HIV-1-infected patients and yielded no clinical benefit [26], were very disappointing which somehow banished the use of rIL-2 in HIV immunotherapy and made the medical community increasingly reluctant to use recombinant cytokines in this context. Greater improvements were seen however, in the ANRS 093 study where patients were randomized to continue either HAART alone or to receive therapeutic vaccination followed by 3 cycles of subcutaneous IL-2 [31].

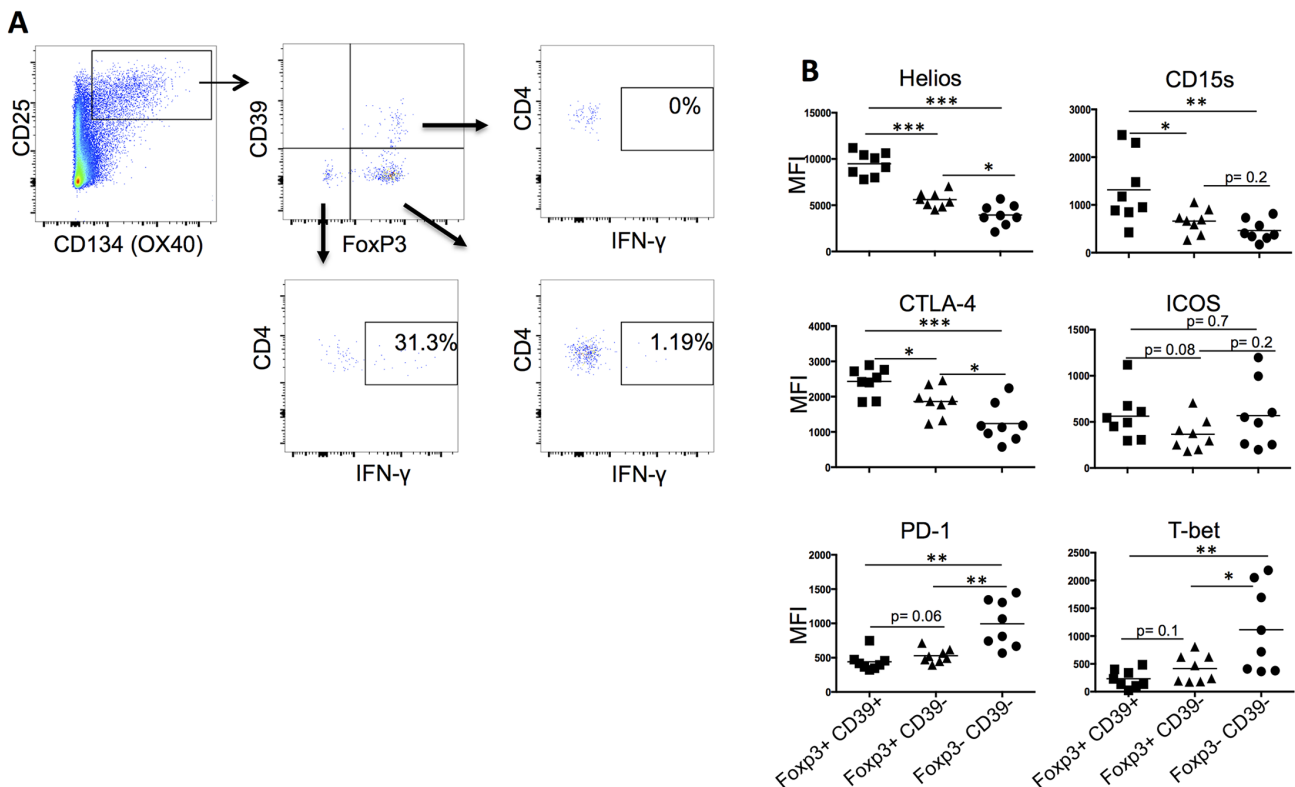


Fig 8. CD25+CD134+ CD39+FoxP3+ cells have bona fide Tregs phenotype. (A) Gating strategy used for detecting CMV-specific CD4+CD25+CD134 + CD39+FoxP3+ Tregs, and IFN- γ producing CD25+CD134+CD39-FoxP3- and CD25+CD134+ CD39-FoxP3+. PBMCs from CMV+ individuals were stimulated with CMV lysate for 44hrs. Flow cytometry was used to detect CMV-specific cells as described in the methods. (B) Mean fluorescence intensity (MFI) of Helios, CD15s, CTLA-4, ICOS, PD-1 and T-bet molecules were measured by flow cytometry in 8 CMV+ individuals to detect CMV-specific subsets (CD134+CD25+Foxp3+CD39+, CD134+CD25+Foxp3+CD39- and CD134+CD25+Foxp3-CD39-). P values were considered significant when < 0.05 .

<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006489.g008>

In this study, we revisited the role of IL-2 in immunotherapy and investigated the dynamics of Tregs subsets in HIV-infected patients receiving therapeutic vaccination combined to IL-2 therapy. We show that while peripheral global CD25⁺CD127^{low}FoxP3⁺ Tregs significantly increased at wk36 after IL-2 therapy, HIV-specific CD39⁺FoxP3⁺ Tregs decreased. Importantly, we show that after IL-2 therapy, there was a significant decrease in HIV-specific CD134⁺CD25⁺CD39⁺FoxP3⁺ Tregs in contrast to IFN- γ -producing CD39⁺FoxP3⁺ and CD39⁻FoxP3⁻ HIV-specific subsets. Why CD39⁻ but not CD39⁺ cells were preferentially expanded by IL-2 treatment remains to be clarified. Interestingly, HIV-specific CD39⁺FoxP3⁺ Tregs were inversely correlated with viral load after treatment interruption, which is reminiscent of our recent report [9]. Moreover, we observed a significant decrease in T-cell exhaustion as demonstrated by the down-regulation of PD-1, Tim-3, 2B4 and Blimp-1 expressions, which inversely correlated with total memory CD25⁺CD127^{low}FoxP3⁺ Tregs but not with HIV-specific CD39⁺FoxP3⁺ Tregs. These results make IL-2 a promising cytokine to be reconsidered for use as an adjuvant in the context of chronic infections as long as it is used in combination with a vaccine. Moreover, timing and dosing of IL-2 need to be carefully considered for each situation, as previous studies showed that exogenous IL-2 is detrimental during the expansion phase after acute LCMV infection for both CD8 and CD4 virus-specific T cells [36]. Of note,

excessive IL-2 during T-cell expansion modulates T-cell differentiation towards terminal effectors, which increases cell death and hampers memory formation, whereas IL-2 administration during contraction led to increased cell survival [36]. Therefore, a careful examination of IL-2 dosing and timing as a means to shift the balance between immunity and tolerance could be the key for future studies.

The benefit in using systemic low-dose IL-2 has been reported in several autoimmune disorders [15–21]. Studies indicated that this approach is well tolerated and the advantageous function of low-dose IL-2 has been linked to the expansion of Tregs in controlling immune responses and establishing tolerance [22]. However, several studies reported that Tregs have an ambiguous role in HIV infection, as they decrease immune activation, which is beneficial for HIV-infected individuals, but they also suppress anti-HIV responses, which is undesirable in such condition (reviewed [1]). Part of this ambiguity is related to Tregs identification and quantification (reviewed in [37]). In addition, there is another important aspect that has never been taken into account and that is the simultaneous examination of the global picture and dynamics of the different Tregs subsets in the same patient. These subsets include HIV-specific, naïve and activated/memory circulating global Tregs. In this study we have delineated the dynamics of Tregs subsets after vaccination and IL-2 therapy, and according to previous studies (SILCAAT and ESPRIT phase III trials) [26,27,38], we found that Tregs frequencies significantly increased. We demonstrated that naïve CD45RO⁻CD25⁺CD127^{low}FoxP3⁺ cells were the most affected by IL-2 treatment as compared to the total memory counterpart. Importantly, we revealed a significant decrease in CD25⁺CD127^{low}FoxP3⁺CD39⁺ Tregs, which were shown to be highly suppressive [6,34]. More interestingly, when we analysed HIV-specific CD39⁺FoxP3⁺ Tregs, we found that they decreased significantly after IL-2 therapy compared to HIV-specific CD39⁺FoxP3⁺ and CD39⁺FoxP3⁻ effectors. It is important to point-out that HIV-specific CD4⁺CD134⁺CD25⁺CD39⁺FoxP3⁺ Tregs correlated positively with viral load after treatment interruption, which suggests that Tregs may represent a potential reservoir for the virus. Indeed, there is strong evidence that Tregs can become latently infected and may represent a potentially important HIV reservoir as i) they expand in blood and tissues in chronically HIV-infected patients and SIV-infected macaques [39]; ii) HIV/SIV DNA levels in Tregs from HIV-infected patients on HAART and SIV-infected rhesus macaques are higher than that of non-Tregs [40,41]; and iii) Tregs are less susceptible to cell death than conventional T cells [39]. As such, therapeutic interventions aiming at Tregs depletion may directly contribute to the reduction of the size of virus reservoir [42]. In addition, IL-2 signaling through CD25 facilitates HIV replication *in vitro* and facilitates homeostatic proliferation of CD25⁺FoxP3⁺CD4⁺ Tregs [39]. Thus the implication of HIV-specific CD39⁺FoxP3⁺ to the establishment of HIV reservoir needs to be clarified and is currently under investigation.

In contrast to HIV-specific CD39⁺FoxP3⁺, both HIV-specific CD39⁺FoxP3⁻ and CD39⁺FoxP3⁻ non-Tregs, which are enriched in IFN- γ producing effectors, inversely correlated with viral load after treatment interruption. These data are in line with previous LCMV mouse studies, where daily therapeutic low-dose IL-2 increased virus-specific T-cell responses, thus resulting in decreased viral burden [43].

There must be a slow turnover of circulating Tregs that are constantly dividing as their absolute number remains constant [44]. It needs to be clarified whether their survival and function relies solely on IL-2. One possible explanation to our results showing a significant increase in global Tregs compared to HIV-specific Tregs after vaccination and IL-2 therapy could be the fact that the former can be exclusively dependent on IL-2 for expansion, survival and function, whereas the latter are largely controlled by signaling through the TCR for their generation. This could explain their role in controlling HIV-specific responses without relying

that much on IL-2 for their function. Indeed, these hypotheses need to be verified in our future investigations.

We have previously shown in Dalia1 clinical study [45] that CD4⁺CD25⁺CD134⁺ HIV-specific responses induced after vaccination, inversely correlated with viral load rebound after treatment interruption [9]. Similar outcomes were found here in ANRS 093 study, where we measured CD4⁺ HIV-specific responses at wk0, wk16 and wk36 using the “OX40 assay”. In the primary ANRS 093 study [30], we have reported that HIV-specific immune responses at wk0, before therapeutic vaccination and IL-2 administration, did not correlate with the control of viral replication following TI in contrast to wk16 responses. In the present study we extend these data, and support the role of IL-2 in boosting pre-existing HIV-specific effector T cells and suggest its use as an adjuvant in combination with an efficient HIV-vaccine.

Another positive outcome in this ANRS 093 study is the significant decrease in CD4⁺ and CD8⁺ CD95⁺PD-1⁺ frequencies as well as in Tim-3, Blimp-1 and expressions at wk36 post IL-2 therapy. This expression of CD95⁺PD-1⁺ on CD4 T cells was inversely correlated with total memory CD25⁺CD127^{low}FoxP3⁺ Tregs. Our results are in accordance with previous data in chronic LCMV infection where IL-2 treatment was associated with decrease expression of inhibitory receptors consistent with a less exhausted phenotype [43]. We believe that our results shed light on the contrasting impact of IL-2, as on one hand we observed an increase in global CD25⁺CD127^{low}FoxP3⁺ Tregs which might impact on T-cell exhaustion, and on another hand a decrease in HIV-specific CD134⁺CD25⁺CD39⁺FoxP3⁺ Tregs, that positively correlated with viral load confirming the non-beneficial role of HIV-specific Tregs in the context of therapeutic vaccination [9]. Altogether, these data uncover some benefits in the use of IL-2 as an adjuvant in HIV-vaccines protocols.

Given that therapeutic vaccines and cytokines have been commonly used to enhance HIV-specific cell-mediated immune responses and to suppress virus replication, revisiting IL-2 for its use as an adjuvant in HIV therapeutic vaccination, appears timely. While the former is important to stimulate HIV-specific T-cell responses, the latter may support the expansion of the stimulated virus-specific T cells. The recent success using checkpoints inhibitors in the cancer field [46], have started to be introduced in preclinical models of HIV with the objective to preserve the function of HIV-specific CD8⁺ T cells from exhaustion and target directly HIV cell reservoir [47–49]. These major advances in immunological intervention strategies provide a rationale for revisiting the use of IL-2 together with immune checkpoint molecules in combinatorial therapeutic strategies to enhance the vaccine-elicited immune response and thus gain more efficient control of virus replication (review in [50]).

Studies using the LCMV model indicated that combined IL-2 and PD-1 blockade therapy represents a promising therapy for increasing CD8 T cell function and reducing viral loads during chronic infection [43]. Additional studies will need to be performed to determine whether IL-2 or combined IL-2 therapy helps “reprogram” exhausted CD8 T cells in humans.

Altogether our data highlight the positive role of IL-2 therapy in HIV infection, as despite an increase in CD25⁺CD127^{low} Tregs, HIV-specific effector CD4⁺ T cells were greatly increased and were able to reduce viral load. This emphasizes the distinct roles that IL-2 therapy can have during an autoimmune manifestation where low-dose IL-2 therapy can increase Tregs, resulting in clinical improvement (reviewed in [22]) and during chronic infection where virus-specific T cells can expand and impact on viral load. Thus combining IL-2 therapy with vaccination seem to be promising and useful in clinical strategy for reversing T cell exhaustion during chronic infections and boosting antigen-specific effector responses leading to an enhanced reduction in viral burden.

Materials and methods

Patients, vaccines and study design

Seventy patients over 18 years, with asymptomatic HIV-1 infection and CD4 T-cell counts > 350 cells/ml and plasma HIV RNA < 50 copies/ml and who have been previously treated with HAART for at least 1 year were eligible. Patients who received subcutaneous IL-2 in a previous study [31], were also eligible and the last cycle was administered at least 3 months prior study entry. Patients were randomized to continue either HAART alone ($n = 37$; control group) or combined with $10^{6.6}$ median infectious dose (ID50) ALVAC vCP 1433 and 3 mg HIV-LIPO-6T (both given by Aventis Pasteur) administered intramuscularly at weeks 0, 4, 8, 12 followed by three cycles of subcutaneous IL-2 (given by Chiron Europe) at weeks 16, 24, 32 (4.5 MIU, twice daily for 5 days) ($n = 33$; vaccine group) (Fig 1a). ALVAC-HIV expresses several HIV genes: for gp120 (MN strain) and a part of the anchoring transmembrane region of gp41 (LAI strain); for the p55 polyprotein, expressed by gag (LAI strain); for a portion of pol encoding the protease; and for genes expressing cytotoxic T lymphocyte peptides from pol and nef. The HIV-LIPO-6T vaccine is a mixture of the tetanus toxoid TT-830-843 class II-restricted universal CD4 epitope combined with five peptides: Gag 17–35, Gag 253–284, Nef 66–97, Nef 116–145 and Pol 325–355 from HIV-1 LAI. Patients with HIV RNA < 50 copies/ml stopped HAART at week 40. Following treatment interruption, HAART was reinitiated if HIV RNA was $> 50\,000$ cp/ml at 4 weeks after interruption or $> 10\,000$ copies/ml at 8 weeks after interruption or thereafter at any protocol follow-up visit.

Blood samples

All experiments were performed on freshly thawed cells that were left to rest for 5–6 hours in human serum-supplemented medium at 37°C.

Flow cytometry staining and phenotyping

All staining experiments were performed at 4°C for 30 minutes. Antibodies used were CD3-PerCPCy5.5, CD3-AF700, CD4-Brilliant Violet 605, CD8-APC-Cy7, CD25-APC, CD134-PE, OX40-APC, TNF- α -PECy7, CD154-APC, CD152-PCF594, Tbet-PerCPCy5.5, PD1-PeCy7, CD15s-Brilliant Violet 421, Helios-PE, ICOS-PeCy7, CD39-Brilliant Violet 711 (Becton Dickinson (BD) Biosciences), CD4-Alexa Fluor 700, IFN- γ -eFluor450, IL2-PerCPE-Fluor710, Streptavidin-Alexa Fluor 700 (eBioscience), FoxP3-Alexa Fluor 488, CD25-Brilliant Violet 421 (BioLegend), CD39-biotin, CD127-PE, CD4-APCVio770, CD3-APCVio770 (Miltenyi biotec), Streptavidin-ECD, CD45RO-ECD (Beckman Coulter). LIVE/DEAD fixable aqua staining kit (Life technologies) was used to discriminate live and dead cells. For intracellular staining, FoxP3 buffer set (eBioscience) was used. Cell acquisition was performed by an LSR II (Becton Dickinson) and analyses were performed using FlowJo software.

T-cell functional assays

The “OX40 assay” is described in details elsewhere [9,51]. Briefly, two million PBMCs or Tregs-depleted cells were plated in 24-well plate and stimulated with 1 μ g/mL CMV lysate (Behring) or 2 μ g/mL of HIV-1 Gag p24 peptide pool for 44 hours. In the last 6 hours, 1 μ g/mL of Brefeldin A (Sigma) was added to block the secretion of IFN- γ , IL-2 and TNF- α . Cells were then collected and stained for subsequent analysis by flow cytometry (BD LSR II).

In some experiments CD39⁺CD4⁺ cells were depleted from PBMCs before performing the “OX40 assay”. Briefly, we first isolated CD4⁺ T cells that were negatively selected using CD4 Microbeads (Miltenyi Biotec). The non-CD4 cell fraction has been collected too and put in a

12 well-plate for the rest of the experiment. On the purified CD4⁺ cells, biotinylated anti-CD39 mAb was added. After incubation and several washes, CD39-labelled CD4⁺ T cells were incubated with anti-biotin Microbeads (Miltenyi Biotec) to positively collect the CD39⁺CD4⁺ fraction. The non-CD39 fraction has been collected too and added to the well together with the non-CD4 to “reconstitute” the PBMCs (CD39⁺CD4⁺-depleted PBMCs). Hence, “OX40 assay” was then performed as described above on total PBMCs and on CD39+CD4+-depleted PBMCs.

EliSpot ELISpot assay

Evaluation of HIV-specific cells producing interferon- γ (IFN- γ) was assessed on frozen total PBMCs and CD39⁺CD4⁺-depleted PBMCs (obtained as described above) and using an ELISPOT assay performed as described [31]. Antigens included 9 or 18 pools of 15-mer peptides covering HIV-1 Gag (11 pools), reverse transcriptase (four pools) and Nef (three pools) (Neosystem) at 2 μ g/ml. The IFN- γ -producing cells were counted using an automated microscope (Zeiss, Le Pecq, France), expressed as spot-forming cells (SFC)/10⁶ PBMC and averaged over triplicate wells. The number of specific SFC/10⁶ PBMC was calculated by subtracting the negative control value (unstimulated cells) from the established SFC count. Positive responses were defined as greater than 100 SFC/10⁶ PBMC over background and at least twofold the background value.

The breadth of the response was the number of recognized pools among 18 pools tested and the magnitude was defined as the sum of positive responses to individual pools (total SFC/10⁶ PBMC).

Statistical analysis

Analyses of differences between pre- and post-vaccination time points were done by Wilcoxon matched-pairs signed rank test. Correlations were assessed by Spearman correlation coefficients.

Prism 5.0, version 5.0d, (GraphPad Software, Inc.) was used for statistical analyses. P values were considered significant when < 0.05.

Ethics statement

Ethics committee (CCPPRB Créteil Henri Mondor) approved this study and written informed consent from all patients, in accordance with the Declaration of Helsinki, were obtained prior to study initiation.

All blood samples used in the study were obtained from ANRS (Agence Nationale de la Recherche sur le SIDA) and were anonymized.

Supporting information

S1 Fig. Mean fluorescence intensity (MFI) of Blimp-1 (A), Tim-3 (B), CD38 (C) and HLA-DR (D) molecules were measured by flow cytometry in CD4⁺CD95⁺ cells from HIV-infected patients at wk0, wk16 and wk36.

(TIFF)

S2 Fig. Mean fluorescence intensity (MFI) of CTLA-4 was measured by flow cytometry in CD4⁺CD25⁺CD134⁺CD39⁺FoxP3⁺, CD4⁺CD25⁺CD134⁺CD39⁻FoxP3⁺ and CD4⁺CD25⁺CD134⁺CD39⁻FoxP3⁻ subsets from an HIV-infected patient at wk0, wk16 and wk36. P values were considered significant when < 0.05.

(TIFF)

S3 Fig. Cytokine expression before and after CD39⁺Tregs depletion. (A, top and bottom panels) Representative flow cytometry experiment (1 out of 5) using « OX40 assay » to measure the frequency of CD134⁺CD25⁺CD4⁺ and CD134⁺CD25⁺CD4⁺ Foxp3⁺CD39⁺ cells after stimulation of total PBMCs or CD39⁺CD4⁺-depleted PBMCs with CMV lysate. (B) TNF- α production in CD134⁺CD25⁺ CMV-specific cells before and after CD39⁺CD4⁺ Tregs depletion. (C) TNF- α production in CD134⁺CD25⁺CD4⁺ after stimulation with CMV lysate in CMV+ individuals (n = 2) or with Gag p24 peptide pool in HIV+ patients (n = 3). SEB was used as a positive control. (D) IFN- γ ELISpot experiments using total PBMCs and CD39⁺CD4⁺-depleted PBMCs (n = 2 HIV-infected patients) stimulated with p24 15-mer peptide pool (SFC are expressed per 10⁶ cells). Prism 5.0, version 5.0d, (GraphPad Software, Inc.) was used for statistical analyses. P values were considered significant when < 0.05. Standard Error of the mean (SEM) are represented for histograms shown in C and D. (TIFF)

S4 Fig. Correlation of CD25⁺CD134⁺CD39⁺FoxP3⁺ HIV-specific Tregs and CD4⁺CD95⁺PD1⁺ at wk36. Correlations were calculated using spearman correlation coefficients (Prism 5.0, version 5.0d). P values were considered significant when < 0.05. (TIFF)

Acknowledgments

The authors would like to thank all patients who participated in the study. They also thank A. Guguin and A. Henry from IMRB facility for cell sorting.

Author Contributions

Conceptualization: Nabila Seddiki.

Formal analysis: Vedran Brezar, Mathieu Surenaud, Nabila Seddiki.

Funding acquisition: Yves Levy, Nabila Seddiki.

Investigation: Nabila Seddiki.

Methodology: Vedran Brezar, Lylia Hani, Mathieu Surenaud, Audrey Hubert.

Resources: Christine Lacabaratz, Jean-Daniel Lelièvre, Yves Levy.

Supervision: Nabila Seddiki.

Validation: Nabila Seddiki.

Visualization: Nabila Seddiki.

Writing – original draft: Vedran Brezar, Nabila Seddiki.

Writing – review & editing: Vedran Brezar, Christine Lacabaratz, Yves Levy, Nabila Seddiki.

References

1. Brezar V, Godot V, Cheng L, Su L, Levy Y, et al. (2016) T-Regulatory Cells and Vaccination "Pay Attention and Do Not Neglect Them": Lessons from HIV and Cancer Vaccine Trials. *Vaccines (Basel)* 4.
2. Miyara M, Yoshioka Y, Kitoh A, Shima T, Wing K, et al. (2009) Functional delineation and differentiation dynamics of human CD4⁺ T cells expressing the FoxP3 transcription factor. *Immunity* 30: 899–911. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2009.03.019> PMID: 19464196
3. Seddiki N, Santner-Nanan B, Martinson J, Zaunders J, Sasson S, et al. (2006) Expression of interleukin (IL)-2 and IL-7 receptors discriminates between human regulatory and activated T cells. *J Exp Med* 203: 1693–1700. <https://doi.org/10.1084/jem.20060468> PMID: 16818676

4. Seddiki N, Santner-Nanan B, Tangye SG, Alexander SI, Solomon M, et al. (2006) Persistence of naive CD45RA⁺ regulatory T cells in adult life. *Blood* 107: 2830–2838. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-06-2403> PMID: 16332974
5. Phetsouphanh C, Xu Y, Amin J, Seddiki N, Procopio F, et al. (2013) Characterization of transcription factor phenotypes within antigen-specific CD4⁺ T cells using qualitative multiplex single-cell RT-PCR. *PLoS One* 8: e74946. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0074946> PMID: 24124462
6. Seddiki N, Cook L, Hsu DC, Phetsouphanh C, Brown K, et al. (2014) Human antigen-specific CD4(+) CD25(+) CD134(+) CD39(+) T cells are enriched for regulatory T cells and comprise a substantial proportion of recall responses. *Eur J Immunol* 44: 1644–1661. <https://doi.org/10.1002/eji.201344102> PMID: 24752698
7. Bacher P, Heinrich F, Stervbo U, Nienen M, Vahldieck M, et al. (2016) Regulatory T Cell Specificity Directs Tolerance versus Allergy against Aeroantigens in Humans. *Cell* 167: 1067–1078 e1016. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.09.050> PMID: 27773482
8. Bacher P, Kniemeyer O, Schonbrunn A, Sawitzki B, Assenmacher M, et al. (2014) Antigen-specific expansion of human regulatory T cells as a major tolerance mechanism against mucosal fungi. *Mucosal Immunol* 7: 916–928. <https://doi.org/10.1038/mi.2013.107> PMID: 24301658
9. Brezar V, Ruffin N, Richert L, Surenaud M, Lacabaratz C, et al. (2015) Decreased HIV-specific T-regulatory responses are associated with effective DC-vaccine induced immunity. *PLoS Pathog* 11: e1004752. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004752> PMID: 25816350
10. Grinberg-Bleyer Y, Baeyens A, You S, Elhage R, Fourcade G, et al. (2010) IL-2 reverses established type 1 diabetes in NOD mice by a local effect on pancreatic regulatory T cells. *J Exp Med* 207: 1871–1878. <https://doi.org/10.1084/jem.20100209> PMID: 20679400
11. Ohl K, Wiener A, Schippers A, Wagner N, Tenbrock K (2015) Interleukin-2 treatment reverses effects of cAMP-responsive element modulator alpha-over-expressing T cells in autoimmune-prone mice. *Clin Exp Immunol* 181: 76–86. <https://doi.org/10.1111/cei.12629> PMID: 25817470
12. Pilon CB, Petillon S, Naserian S, Martin GH, Badoual C, et al. (2014) Administration of low doses of IL-2 combined to rapamycin promotes allogeneic skin graft survival in mice. *Am J Transplant* 14: 2874–2882. <https://doi.org/10.1111/ajt.12944> PMID: 25394722
13. Rabinovitch A, Suarez-Pinzon WL, Shapiro AM, Rajotte RV, Power R (2002) Combination therapy with sirolimus and interleukin-2 prevents spontaneous and recurrent autoimmune diabetes in NOD mice. *Diabetes* 51: 638–645. PMID: 11872661
14. Tang Q, Adams JY, Penaranda C, Melli K, Piaggio E, et al. (2008) Central role of defective interleukin-2 production in the triggering of islet autoimmune destruction. *Immunity* 28: 687–697. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2008.03.016> PMID: 18468463
15. Castela E, Le Duff F, Butori C, Ticchioni M, Hofman P, et al. (2014) Effects of low-dose recombinant interleukin 2 to promote T-regulatory cells in alopecia areata. *JAMA Dermatol* 150: 748–751. <https://doi.org/10.1001/jamadermatol.2014.504> PMID: 24872229
16. Hartemann A, Bensimon G, Payan CA, Jacqueminet S, Bourron O, et al. (2013) Low-dose interleukin 2 in patients with type 1 diabetes: a phase 1/2 randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet Diabetes Endocrinol* 1: 295–305. [https://doi.org/10.1016/S2213-8587\(13\)70113-X](https://doi.org/10.1016/S2213-8587(13)70113-X) PMID: 24622415
17. Humrich JY, von Spee-Mayer C, Siegert E, Alexander T, Hiepe F, et al. (2015) Rapid induction of clinical remission by low-dose interleukin-2 in a patient with refractory SLE. *Ann Rheum Dis* 74: 791–792. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2014-206506> PMID: 25609413
18. Koreth J, Matsuoka K, Kim HT, McDonough SM, Bindra B, et al. (2011) Interleukin-2 and regulatory T cells in graft-versus-host disease. *N Engl J Med* 365: 2055–2066. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1108188> PMID: 22129252
19. Matsuoka K, Koreth J, Kim HT, Bascug G, McDonough S, et al. (2013) Low-dose interleukin-2 therapy restores regulatory T cell homeostasis in patients with chronic graft-versus-host disease. *Sci Transl Med* 5: 179ra143.
20. Rosenzweig M, Churlaud G, Mallone R, Six A, Derian N, et al. (2015) Low-dose interleukin-2 fosters a dose-dependent regulatory T cell tuned milieu in T1D patients. *J Autoimmun* 58: 48–58. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2015.01.001> PMID: 25634360
21. Saadoun D, Rosenzweig M, Joly F, Six A, Carrat F, et al. (2011) Regulatory T-cell responses to low-dose interleukin-2 in HCV-induced vasculitis. *N Engl J Med* 365: 2067–2077. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1105143> PMID: 22129253
22. Klatzmann D, Abbas AK (2015) The promise of low-dose interleukin-2 therapy for autoimmune and inflammatory diseases. *Nat Rev Immunol* 15: 283–294. <https://doi.org/10.1038/nri3823> PMID: 25882245


23. Klapper JA, Downey SG, Smith FO, Yang JC, Hughes MS, et al. (2008) High-dose interleukin-2 for the treatment of metastatic renal cell carcinoma: a retrospective analysis of response and survival in patients treated in the surgery branch at the National Cancer Institute between 1986 and 2006. *Cancer* 113: 293–301. <https://doi.org/10.1002/cncr.23552> PMID: 18457330
24. Schwartzenuber DJ, Lawson DH, Richards JM, Conry RM, Miller DM, et al. (2011) gp100 peptide vaccine and interleukin-2 in patients with advanced melanoma. *N Engl J Med* 364: 2119–2127. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1012863> PMID: 21631324
25. Smith FO, Downey SG, Klapper JA, Yang JC, Sherry RM, et al. (2008) Treatment of metastatic melanoma using interleukin-2 alone or in conjunction with vaccines. *Clin Cancer Res* 14: 5610–5618. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-08-0116> PMID: 18765555
26. Abrams D, Levy Y, Lusso MH, Babiker A, Collins G, et al. (2009) Interleukin-2 therapy in patients with HIV infection. *N Engl J Med* 361: 1548–1559. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0903175> PMID: 19828532
27. Weiss L, Letimier FA, Carriere M, Maiella S, Donkova-Petrini V, et al. (2010) In vivo expansion of naive and activated CD4+CD25+FOXP3+ regulatory T cell populations in interleukin-2-treated HIV patients. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 10632–10637. <https://doi.org/10.1073/pnas.1000027107> PMID: 20498045
28. Nacsa J, Edghill-Smith Y, Tsai WP, Venzon D, Trynieszewska E, et al. (2005) Contrasting effects of low-dose IL-2 on vaccine-boostered simian immunodeficiency virus (SIV)-specific CD4+ and CD8+ T cells in macaques chronically infected with SIVmac251. *J Immunol* 174: 1913–1921. PMID: 15699118
29. Trynieszewska E, Nacsa J, Lewis MG, Silvera P, Montefiori D, et al. (2002) Vaccination of macaques with long-standing SIVmac251 infection lowers the viral set point after cessation of antiretroviral therapy. *J Immunol* 169: 5347–5357. PMID: 12391256
30. Levy Y, Durier C, Lascaux AS, Meiffredy V, Gahery-Segard H, et al. (2006) Sustained control of viremia following therapeutic immunization in chronically HIV-1-infected individuals. *AIDS* 20: 405–413. <https://doi.org/10.1097/01.aids.0000206504.09159.d3> PMID: 16439874
31. Levy Y, Gahery-Segard H, Durier C, Lascaux AS, Goujard C, et al. (2005) Immunological and virological efficacy of a therapeutic immunization combined with interleukin-2 in chronically HIV-1 infected patients. *AIDS* 19: 279–286. PMID: 15718838
32. Day CL, Kaufmann DE, Kiepiela P, Brown JA, Moodley ES, et al. (2006) PD-1 expression on HIV-specific T cells is associated with T-cell exhaustion and disease progression. *Nature* 443: 350–354. <https://doi.org/10.1038/nature05115> PMID: 16921384
33. Wherry EJ (2011) T cell exhaustion. *Nat Immunol* 12: 492–499. PMID: 21739672
34. Jenabian MA, Seddiki N, Yatim A, Carriere M, Hulin A, et al. (2013) Regulatory T cells negatively affect IL-2 production of effector T cells through CD39/adenosine pathway in HIV infection. *PLoS Pathog* 9: e1003319. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003319> PMID: 23658513
35. Miyara M, Chader D, Sage E, Sugiyama D, Nishikawa H, et al. (2015) Sialyl Lewis x (CD15s) identifies highly differentiated and most suppressive FOXP3high regulatory T cells in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112: 7225–7230. <https://doi.org/10.1073/pnas.1508224112> PMID: 26015572
36. Blattman JN, Grayson JM, Wherry EJ, Kaech SM, Smith KA, et al. (2003) Therapeutic use of IL-2 to enhance antiviral T-cell responses in vivo. *Nat Med* 9: 540–547. <https://doi.org/10.1038/nm866> PMID: 12692546
37. Simonetta F, Bourgeois C (2013) CD4+FOXP3+ Regulatory T-Cell Subsets in Human Immunodeficiency Virus Infection. *Front Immunol* 4: 215. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2013.00215> PMID: 23908654
38. Sereti I, Imamichi H, Natarajan V, Imamichi T, Ramchandani MS, et al. (2005) In vivo expansion of CD4CD45RO-CD25 T cells expressing foxP3 in IL-2-treated HIV-infected patients. *J Clin Invest* 115: 1839–1847. <https://doi.org/10.1172/JCI24307> PMID: 15937547
39. Moreno-Fernandez ME, Presicce P, Chougnet CA (2012) Homeostasis and function of regulatory T cells in HIV/SIV infection. *J Virol* 86: 10262–10269. <https://doi.org/10.1128/JVI.00993-12> PMID: 22811537
40. Allers K, Loddenkemper C, Hofmann J, Unbehauen A, Kunkel D, et al. (2010) Gut mucosal FOXP3+ regulatory CD4+ T cells and Nonregulatory CD4+ T cells are differentially affected by simian immunodeficiency virus infection in rhesus macaques. *J Virol* 84: 3259–3269. <https://doi.org/10.1128/JVI.01715-09> PMID: 20071575
41. Tran TA, de Goer de Herve MG, Hendel-Chavez H, Dembele B, Le Nevot E, et al. (2008) Resting regulatory CD4 T cells: a site of HIV persistence in patients on long-term effective antiretroviral therapy. *PLoS One* 3: e3305. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003305> PMID: 18827929

42. He T, Brocca-Cofano E, Policicchio BB, Sivanandham R, Gautam R, et al. (2016) Cutting Edge: T Regulatory Cell Depletion Reactivates Latent Simian Immunodeficiency Virus (SIV) in Controller Macaques While Boosting SIV-Specific T Lymphocytes. *J Immunol* 197: 4535–4539. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1601539> PMID: 27837106
43. West EE, Jin HT, Rasheed AU, Penaloza-Macmaster P, Ha SJ, et al. (2013) PD-L1 blockade synergizes with IL-2 therapy in reinvigorating exhausted T cells. *J Clin Invest* 123: 2604–2615. <https://doi.org/10.1172/JCI67008> PMID: 23676462
44. Sakaguchi S, Miyara M, Costantino CM, Hafler DA (2010) FOXP3+ regulatory T cells in the human immune system. *Nat Rev Immunol* 10: 490–500. <https://doi.org/10.1038/nri2785> PMID: 20559327
45. Levy Y, Thiebaut R, Montes M, Lacabaratz C, Sloan L, et al. (2014) Dendritic cell-based therapeutic vaccine elicits polyfunctional HIV-specific T-cell immunity associated with control of viral load. *Eur J Immunol* 44: 2802–2810. <https://doi.org/10.1002/eji.201344433> PMID: 25042008
46. Greenwald RJ, Freeman GJ, Sharpe AH (2005) The B7 family revisited. *Annu Rev Immunol* 23: 515–548. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.23.021704.115611> PMID: 15771580
47. Petrovas C, Casazza JP, Brenchley JM, Price DA, Gostick E, et al. (2006) PD-1 is a regulator of virus-specific CD8+ T cell survival in HIV infection. *J Exp Med* 203: 2281–2292. <https://doi.org/10.1084/jem.20061496> PMID: 16954372
48. Porichis F, Kwon DS, Zupkosky J, Tighe DP, McMullen A, et al. (2011) Responsiveness of HIV-specific CD4 T cells to PD-1 blockade. *Blood* 118: 965–974. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-12-328070> PMID: 21652684
49. Trautmann L, Janbazian L, Chomont N, Said EA, Gimmig S, et al. (2006) Upregulation of PD-1 expression on HIV-specific CD8+ T cells leads to reversible immune dysfunction. *Nat Med* 12: 1198–1202. <https://doi.org/10.1038/nm1482> PMID: 16917489
50. Pantaleo G, Levy Y (2016) Therapeutic vaccines and immunological intervention in HIV infection: a paradigm change. *Curr Opin HIV AIDS* 11: 576–584. <https://doi.org/10.1097/COH.0000000000000324> PMID: 27607591
51. Zaunders JJ, Levy Y, Seddiki N (2014) Exploiting differential expression of the IL-7 receptor on memory T cells to modulate immune responses. *Cytokine Growth Factor Rev* 25: 391–401. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2014.07.012> PMID: 25130296

Annexe 3.

REVUE. From dendritic cells to B cells dysfunctions during HIV-1 infection: T follicular helper cells at the crossroads. Immunology. 2017

From dendritic cells to B cells dysfunctions during HIV-1 infection: T follicular helper cells at the crossroads

Nicolas Ruffin,¹ Lylia Hani² and Nabila Seddiki² 

¹Institut Curie, INSERM U932, PSL Research University, Paris, and ²Vaccine Research Institute (VRI), Faculté de médecine, INSERM U955, Université Paris Est, Créteil Cedex, France

doi:10.1111/imm.12730

Received 16 January 2017; revised 10 February 2017; accepted 14 February 2017.

Correspondence: Nicolas Ruffin, Institut Curie/INSERM U932, 12 rue Lhomond, 75005 Paris, France.

Email: nicolas.ruffin@curie.fr and

Nabila Seddiki, INSERM U955 Eq16, Université Paris-Est Créteil & Vaccine Research Institute, Hôpital Henri Mondor Bâtiment Recherche 1er étage, 51 Ave du Maréchal de Lattre de Tassigny, 94010 Créteil, France.

Email: nabila.seddiki@inserm.fr

Senior author: Nabila Seddiki

Summary

T follicular helper (Tfh) cells are essential for B-cell differentiation and the subsequent antibody responses. Their numbers and functions are altered during human and simian immunodeficiency virus (HIV/SIV) infections. In lymphoid tissues, Tfh cells are present in germinal centre, where they are the main source of replicative HIV-1 and represent a major reservoir. Paradoxically, Tfh cell numbers are increased in chronically infected individuals. Understanding the fate of Tfh cells in the course of HIV-1 infection is essential for the design of efficient strategies toward a protective HIV vaccine or a cure. The purpose of this review is to summarize the recent advance in our understanding of Tfh cell dynamics during HIV/SIV infection. In particular, to explore the possible causes of their expansion in lymphoid tissues by discussing the impact of HIV-1 infection on dendritic cells, to identify the molecular players rendering Tfh cells highly susceptible to HIV-1 infection, and to consider the contribution of regulatory follicular T cells in shaping Tfh cell functions.

Keywords: dendritic cells; germinal centre; HIV-1; SAM domain and HD domain-containing protein 1; T follicular helper cell.

Human immunodeficiency virus (HIV) cure and the development of an effective vaccine are dependent on a better understanding of the immune system in healthy individuals, as well as in HIV-1-infected subjects. Recent advance in the characterization of broadly neutralizing antibodies have proven their potency in preventing infection in animal models and also to decrease HIV-1 viral load in humans.¹ However, only a small proportion of HIV-1-infected individuals generate broadly neutralizing antibodies, and B-cell functions are impaired during HIV-1 infection.²

B-cell maturation and differentiation toward memory and plasma cells is dependent on a subset of CD4⁺ T cells that express CXCR5 and migrate to B-cell follicles, namely T follicular helper (Tfh) cells.³ The differentiation

of naive CD4⁺ T cells toward Tfh cells is a multistep programme in which cell-to-cell contacts as well as cytokine environment are critical.^{4,5} Mature antigen-presenting cells migrate from the periphery to the lymphoid tissues to activate their cognate naive CD4⁺ T cells in the T-cell zone. Upon activation, CD4⁺ T cells up-regulate CXCR5 and migrate to the B-cell zone where they will encounter cognate B cells. The T-cell–B-cell interactions through surface proteins provide further signals allowing pre-Tfh cells to enter the B-cell follicles and facilitate the germinal center (GC) reaction. Several cytokines, such as interleukin-6 (IL-6), IL-21 and IL-12 have been involved in the development of Tfh cells.^{4,6}

After considering the recent data on Tfh cell dynamics in HIV/simian immunodeficiency virus (SIV)

Abbreviations: ART, antiretroviral therapy; Blimp-1, B lymphocyte induced maturation protein 1; CCR, C-C chemokine receptor; cDC, conventional dendritic cell; DCs, dendritic cells; FoxP3, forkhead box P3; GC, germinal center; HIV, human immunodeficiency virus; IFN, interferon; IL, interleukin; LCMV, lymphocytic choriomeningitis virus; LN, lymph node; pDC, plasmacytoid dendritic cell; PD-L, programmed death-ligand; PD, programmed death; SAMHD1, SAM domain and HD domain-containing protein 1; SIV, simian immunodeficiency virus; Tfc, follicular cytotoxic T; Tfh, T follicular helper; Tfr, follicular regulatory T; TGF- β , transforming growth factor β ; Th, T helper; TLR, toll-like receptor; Treg, regulatory T

infection, we herein discuss (i) the dynamics and functions of dendritic cells (DCs) during HIV-1 infection, (ii) how lymph node (LN) B cells of HIV-1-infected individuals impair Tfh cell functions, and (iii) the involvement of newly described follicular regulatory and follicular cytotoxic T cells in shaping Tfh cells in HIV/SIV infection.

Tfh cell differentiation and functions are altered during HIV-1 infection

Replication of HIV occurs mainly in lymphoid tissues,^{7–9} particularly in CD4⁺ T cells, although some infected macrophages have been observed.¹⁰ Following their discovery in the early 2000s, Tfh cells in the context of HIV and SIV infection have been under intense investigation. These cells are depleted during acute SIV/HIV infection¹¹ whereas their numbers are higher in the chronic stages of the disease compared with uninfected individuals,^{12–18} before decreasing in AIDS subjects.^{19,20} HIV-1 treatment induces the normalization of Tfh cell numbers in LNs from patients,¹³ and no statistical differences are observed between HIV-1-infected treated individuals and non-infected controls.^{12,21} Similarly, Tfh cell frequencies in gut biopsies did not differ from those observed in treated HIV-1-positive and -negative individuals.²² Importantly, Tfh cells form an important reservoir during HIV/SIV infection.²³

Expansion of Tfh cells in LNs from chronically HIV-1-infected individuals correlates with the viraemia¹³ and is associated with gammaglobulinaemia and skewing of B-cell phenotype.^{12,13,16} Importantly, Tfh cells exhibit the highest levels of HIV-1/SIV DNA and RNA compared with other LN CD4⁺ T-cell subsets,^{13,14,18,24} and replicative HIV-1 virions can be recovered from activated Tfh cells isolated from viraemic patients.¹³ Eventually, sorted Tfh cells were shown to be highly susceptible to HIV-1 infection.^{13,21,24} The susceptibility of Tfh cells to HIV-1 infection compared with other LN or tonsillar CD4⁺ T cells is associated with a lack of SAM domain and HD domain-containing protein 1 (SAMHD1) expression in those cells.²¹ Moreover, we showed that the expression of the restriction factor SAMHD1 decreases with T-cell proliferation and inversely correlates with CD4⁺ T-cell susceptibility to HIV-1 infection.²¹ SAMHD1 is a triphosphohydrolase enzyme that controls the intracellular level of deoxyribonucleoside triphosphates. SAMHD1 plays a role in innate immune sensing and autoimmune disease, and restricts HIV-1 infection; its expression is regulated with cell cycling.²⁵ Whether the low expression of SAMHD1 is an intrinsic characteristic of Tfh cells, or is a consequence of their cycling capacity remains to be determined.

The function of Tfh cells is usually measured by their capacity to produce IL-21. Although a decreased IL-21

production by Tfh cells has been observed in untreated HIV-1 infection¹⁶ or SIV-infection,¹⁹ others observed higher levels of IL-21⁺ Tfh cells in LNs from HIV-1-untreated individuals compared with controls.¹³ In our cohort, we found comparable frequencies of IL-21⁺ CD4⁺ T cells between treated HIV-1-positive subjects and controls.²¹ The production of IL-21 by Tfh is crucial for their ability to induce B-cell maturation and differentiation.^{26,27} B cells, in turn, also impact IL-21 production by Tfh cells in HIV-1 infection, as further discussed below.¹⁶ The ability to produce IL-21 by Tfh cells during chronic HIV-1 infection was recently associated with a preferential differentiation of Tfh cells towards a T helper type 1 (Th1)-like phenotype.²⁸ The Th1/Th17 balance of Tfh cells has been shown to be important in several diseases.²⁹ Importantly, we showed that LN percentages of CD4⁺ T cells producing IL-17A were lower in HIV-1-infected patients under antiretroviral therapy (ART) compared with healthy subjects.²¹ In line with those results, C-C chemokine receptor 6 positive (CCR6⁺) Tfh cells, which were shown to produce IL-17,³⁰ are depleted in SIV infection.²⁸ As IL-17A promotes GC B-cell migration toward CXCL12 and CXCL13 *in vitro*,³¹ changes in IL-17A levels may also play a role in the aberrant B-cell responses seen in HIV-1-infected individuals. Indeed, blood memory PD-1⁺ CXCR5^{hi} CCR6^{hi} “Tfh17” cells capable of providing help to B cells are decreased in chronic HIV infection, but they recover after ART.³² Further studies are needed to better define the physiological role of IL-17 signalling in normal human GC B cells.

The reasons for Tfh cell accumulation during the chronic phase of HIV-1 infection despite their high susceptibility to the virus are not clear. A better understanding of the dynamics of DC functions during HIV-1 infection is necessary because those cells are the initiators of Tfh development, as we discuss below.

Impact of HIV-1 on DCs

Due to their localization at the mucosa, where most HIV-1 transmission occurs, DCs are thought to be crucial for the establishment of the infection.³³ Upon uptake of HIV-1 at the mucosa, DCs migrate to lymphoid tissues where they can transfer the virus to activated CD4⁺ T cells. DCs are sentinels distributed through the tissues and the blood. They are equipped with various receptors that render them able to sense HIV-1 virions.³⁴ Langerhans cells, present in the mucosa, are likely to play a role in the establishment of HIV-1 infection.³³ Plasmacytoid DCs (pDC) and conventional DCs (cDC1 and cDC2) are present in peripheral blood, and are recruited at the mucosal site upon inflammation. Both pDCs and cDCs express the class II major histocompatibility complex protein HLA-DR, but pDCs display CD123 (IL-3 receptor) whereas cDCs are defined phenotypically by the

expression of CD11c. Functionally, cDCs act as antigen-presenting cells, whereas pDCs respond to viral infection by secreting copious amount of type I interferon (IFN).

The necessary interaction between naive CD4⁺ T cells and DCs to drive Tfh cell differentiation comes essentially from studies in mice.^{35,36} Recent studies in humans have shown that DCs have the capacity to induce Tfh-like cells *in vitro*.^{37,38} These studies point to a role for IL-12, but also IL-6 in driving the expression of Tfh cell markers, depending on the activation signals given to monocyte-derived DCs. Transforming growth factor- β (TGF- β) acts also, together with IL-12 and IL-23, in the differentiation of Tfh-like cells.³⁹ In addition, a role for IL-27 was reported in Tfh cell priming by DCs *in vitro*.⁴⁰ Given the limited amount of human DCs in blood and the difficulties in accessing tissue DCs, data are scarce on the factors essential for the priming of human Tfh cells *in vivo*. A subset of DCs from human female reproductive tracts were shown to capture HIV-1 virions *ex vivo*, which induced their activation and subsequently CD4⁺ T-cell proliferation.⁴¹ The CD4⁺ T-cell polarization by HIV-1-exposed and/or infected DCs remains to be evaluated.

Few reports have shown that the susceptibility of DCs to HIV-1 infection is rather limited, but both CD11c⁺ cDCs and CD123⁺ pDCs could be infected *ex vivo*.^{42,43} The low permissibility of DCs to HIV-1 infection is most likely due to high expression of SAMHD1.⁴⁴ The addition of the HIV-2/SIV-encoded protein Vpx *in vitro*, which inhibits SAMHD1, induces a much higher proportion of infection.

In vitro HIV-1 culture, as well as *in vivo* HIV-1 and SIV infections, lead to HIV-1 uptake by pDCs and type I IFN release. The nucleic acids contained in HIV-1 virions activate toll-like receptor 7 (TLR7) in endosomes and induce the release of IFN- α through interferon regulatory factor-3 activation.^{34,45} Plasmacytoid DCs are thought to be an important driver of immune activation through their release of type I IFN, and IFN- α levels are elevated in HIV-1-infected individuals.⁴⁶ The release of IFN- α by pDCs upon culture with HIV-1^{42,47} reflects the maturation of the cells and is accompanied by the expression of CD83 and CCR7, as well as the co-stimulatory molecules CD80 and CD86.⁴⁷ CCR7 expression allows pDCs to migrate toward lymphoid tissues. Although HIV-1 does not directly induce cDC maturation *in vitro*, supernatant of pDCs cultured with HIV-1 led to the increase in CD83, CD80 and CD86 expression on cDCs.⁴⁷ Others have shown that HIV-1 induces the production of IL-6 and tumour necrosis factor- α by cDCs,⁴⁸ although the expression of maturation markers was only modestly increased.^{42,48} Notably, studies in SIV models show that non-pathogenic SIV infection of African green monkeys leads also to IFN- α production, but is limited to the acute phase.⁴⁵

Dynamics of blood and tissue DCs during HIV-1 infection

Phenotypical studies of peripheral blood DCs have revealed that the levels of both cDCs (HLA-DR⁺ CD11c⁺) and pDCs (HLA-DR⁺ CD123⁺) are decreased in HIV-1-infected subjects.^{49–56} Others showed that pDC levels were increased in non-treated HIV-1-infected individuals with CD4 counts > 400 cells/ μ l, whereas they declined strongly in patients with AIDS.⁵⁵ Blood dendritic cell antigen positive cDC1 levels were also found to be lower in infected subjects compared with HIV-1-negative controls, whereas similar levels of total CD11c⁺ cDCs were observed in the two groups.⁵² In most studies, low levels of CD11c⁺ and CD123⁺ DCs inversely correlated with viral load and/or CD4 decline.^{50–52,56,57} Longitudinal studies showed that ART initiation leads to an increase of both cDC and pDC subsets, although not reaching those of HIV-1-negative controls for the latter.⁵⁸ Others, however, did not observe a normalization of peripheral DC numbers in HIV-1-infected individuals under ART.^{50,51} Some reported an increase of cDC levels in HIV-1-infected individuals with CD4 T-cell counts > 500 cells/ μ l compared with controls.⁵⁹

Studies of SIV infection showed a similar decrease in pDC levels in peripheral blood,^{60,61} whereas CD1c⁺ cDCs were at higher numbers compared with non-infected animals⁶⁰ but were also depleted in animals with AIDS.⁶¹ Longitudinal studies of SIV-infected macaques showed a rapid increase of blood cDC and pDC subsets during the first week post-infection in peripheral blood.⁶² Thereafter, during the advanced stages of the disease, DC proportions declined to lower levels compared with non-infected animals.⁶²

Lower numbers of circulating DCs during HIV/SIV infection are also associated with altered functions. Blood cDCs from viraemic HIV-1-infected individuals spontaneously secrete IL-6 and IL-12 *ex vivo*.⁵⁷ Co-stimulatory molecule expression is also increased. CD86 and CD40 expression was found at higher levels on blood HLA-DR⁺ cells from HIV-1-positive individuals compared with controls, with the highest CD40 expression observed on cDCs from non-treated HIV-1-positive individuals.⁵¹ Importantly, ART induced normalization of both CD86 and CD40 expression on total HLA-DR⁺ cells.⁵¹ The ability of cDCs to stimulate allogeneic T cells is not altered between HIV-1-infected and negative individuals.^{52,63} Similarly, in line with the decreased levels of pDCs, IFN- α production in response to viruses measured in PBMCs is lower in HIV-1-infected individuals compared with controls.^{52,64}

While DC blood levels decrease during HIV/SIV infection these numbers were found at higher levels in lymphoid tissues from infected monkeys^{62,65} and humans,^{53,54,66,67} pointing to their recruitment into the lymphoid organs. As the disease progresses towards AIDS,

however, SIV macaques display a depletion of DCs in LNs.⁶¹ The pDCs that are recruited to LNs, form clusters in the interfollicular regions (Fig. 1).^{66,67} Clustering of

pDCs was shown to inversely correlate with the CD4⁺ T-cell count and to increase with progressing HIV-associated lymphadenopathy.⁶⁷

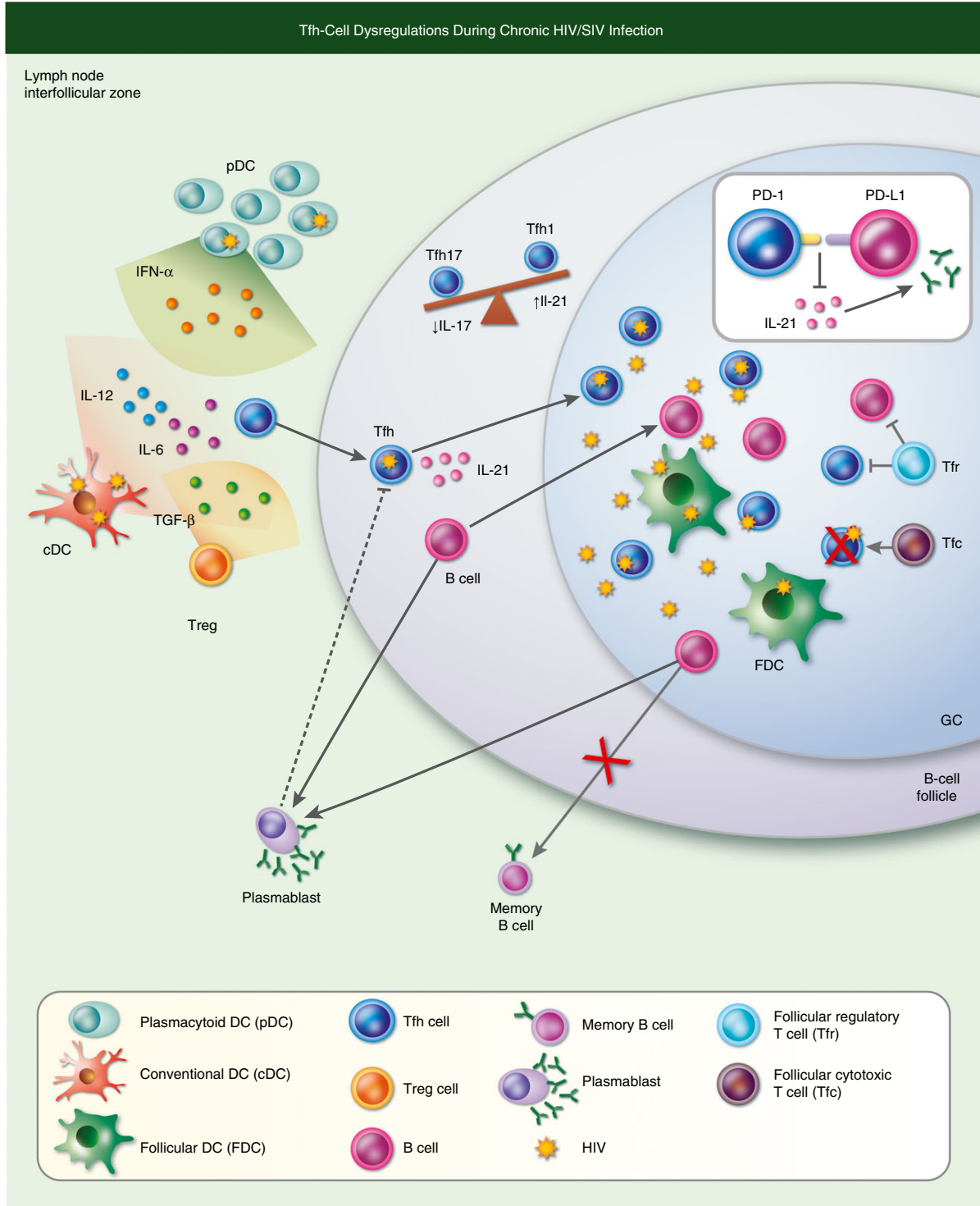


Figure 1. Follicular helper T (Tfh) cell dysregulations during chronic HIV/SIV infection.

Limited data are available on the functions of LN DCs. Conventional DCs isolated from LNs of HIV-1-infected individuals were shown to spontaneously produce IL-12 *ex vivo*, which increased upon TLR stimulation. *Ex vivo* tumour necrosis factor- α production by cDCs and pDCs was low but also increased following TLR activation. The LN pDCs needed TLR stimulation to produce measurable levels of IFN- α .⁵⁴ In this study, the authors did not compare the functions of LN DCs from HIV-1-infected subjects with non-infected controls, so limiting the extent of the findings. In contrast to circulating DCs, the ability of LN DCs to respond to TLR stimulation and supporting T-cell responses *ex vivo* has been shown to be altered during SIV infection.⁶⁸ This outcome results from a lower ability of pDCs and cDCs isolated from LNs of SIV-infected macaques to produce IFN- α and IL-12 upon TLR stimulation compared with naive controls.⁶⁸

In a recent study, skin DC numbers were similar in HIV-positive and HIV-negative individuals, confirming that the lower levels of DCs measured in the blood are not general.⁶⁹ When measuring the infiltration of DCs in the skin after challenge with antigen, however, DC numbers were lower in skin from HIV-1-infected individuals compared with control, with the lowest numbers found in individuals with AIDS,⁶⁹ suggesting that DC recruitment to inflamed tissue might be impaired during HIV-1 infection.

More work is still needed to decipher the interplay between HIV-1 and primary DCs from blood and tissues, especially in term of maturation, migration and T-cell priming. Indeed, with the recent advances in DC biology and subset functions,⁷⁰ it would be crucial to evaluate the susceptibility of these different DCs to HIV-1 infection and their ability to induce Tfh cells upon HIV-1 exposure.

How DCs may drive Tfh differentiation during HIV-1 infection

Type I IFN production by pDCs as well as their recruitment to lymphoid tissues is a hallmark of HIV-1 infection (Fig. 1). Interestingly, type I IFN induces expression of bcl-6, CXCR5 and programmed death 1 (PD-1) during naive CD4⁺ T-cell activation, through the activation of signal transducer and activator of transcription 1.⁷¹ The authors showed, however, that IL-21 production was not induced by IFN- α/β .

It remains to be established whether the increased numbers of Tfh observed during chronic HIV-1 infection are associated with pDC recruitment to the lymphoid tissues. Importantly, mice with persistent viral infection also display an accumulation of Tfh cells in lymphoid tissues.⁷² Indeed, a preferential differentiation of lymphocytic choriomeningitis virus (LCMV) -specific naive CD4⁺ T cells into Tfh cells is observed in the context of persistent LCMV infection. This imbalance toward Tfh

cell differentiation is dependent on type I IFN, IL-10 and programmed death ligand 1 (PD-L1). Type I IFN stimulates the expression of PD-L1 and the production of IL-10 by DCs, which in turn drives naive CD4⁺ T cells towards a Tfh phenotype.⁷² Of note, IFN- α has also been recently involved in B-cell apoptosis and differentiation toward short-lived plasmablast,^{73,74} in a similar way to what has been described in HIV-1-infected patients.

Other cytokines that are found at increased levels in HIV-1-positive individuals favour Tfh differentiation. That is the case for IL-6, which is required for the early stages of Tfh development.⁷⁵ As mentioned, TGF- β can participate to the differentiation of naive CD4⁺ T cells into Tfh cells in humans.³⁹ The authors showed TGF- β production by tonsillar CD11c⁺ cells in the T-cell zone. Notably, TGF- β levels are higher during HIV-1/SIV infection and are associated with regulatory T-cell accumulation and disease progression (Fig. 1).⁷⁶ Furthermore, TGF- β is an important cytokine driving the fibrosis of lymphoid organs during HIV-1/SIV infection.⁷⁷ It would therefore be important to analyse Tfh cell dynamics and functions in association with TGF- β levels in HIV-1-infected individuals.

Alterations of GC B-cell impact on Tfh cells during HIV-1 infection

Despite higher levels of Tfh cells, B-cell responses are impaired in HIV-1-infected individuals.² Cognate Tfh-B-cell interactions are essential for the GC reaction and PD-1 expression by Tfh cells is important for appropriate GC B-cell development. Although no difference in PD-1 expression was found on Tfh cells from HIV-1-infected individuals compared with healthy controls,¹⁶ *in vitro* HIV-1 infection of Tfh cells leads to a decrease in PD-1 surface expression.²⁴

The ligands for PD-1, namely PD-L1 and PD-L2, are expressed by DCs, macrophages and also B cells. PD-L1 expression by cDCs in the LNs of HIV-1-infected individuals was observed,⁵⁴ as well as macrophages.⁶⁸ Studies of SIV-infected macaques have shown that while PD-L1 is increased on LN B cells, their expression of PD-L2 is decreased compared with non-infected animals.¹⁹ PD-L1 was also reported to be expressed at higher levels on GC B cells during HIV-1 infection.¹⁶ Importantly, autologous Tfh-B-cell co-cultures from SIV-infected macaques or HIV-1-infected patients led to a defect in IgG production compared with co-cultures of cells isolated from healthy subjects (Fig. 1).^{16,19} In those studies, however, Tfh cells from infected subjects showed high levels of apoptosis, and it cannot be excluded that Tfh viability impacts the *in vitro* co-culture experiments. Nevertheless, blocking PD-L1/L2 improves IgG secretion of B cells co-cultured with Tfh cells from HIV-1-infected individuals.¹⁶ The authors showed that the triggering of PD-1 on tonsillar

Tfh cells, leads to decreased cell proliferation, to a lower expression of inducible T-cell co-stimulator as well as a lower production of IL-21 upon T-cell stimulation (Fig. 1).¹⁶ Importantly, as anti-PD-1 treatment is thought to be a good candidate for immunotherapy in HIV-1-infected individuals, it would be critical to evaluate its effects on Tfh cells in this context.⁷⁸

Dysfunction of Tfh cells is also characterized by decreased IL-21 production in HIV-1 infection¹⁶ or SIV infection.¹⁹ In contrast, we and others did not observe defects in IL-21 production by LN CD4⁺ T cells.^{13,21} Of note, IL-21 treatment of SIV-1-infected macaques induced an increase in circulating memory B cells and in SIV-specific IgG antibody levels in the serum compared with controls, without, however, affecting viral load.⁷⁹

We reviewed previously the possible reasons for B-cell dysfunctions during HIV-1 infection.^{2,80} Further investigations of GC B cells during HIV-1 infection are needed, as the crosstalk between Tfh and B cells is crucial for an effective humoral response. In addition, an increase in plasma cells has also been observed during HIV-1 infection^{81,82} where they accumulate in the interfollicular regions.⁶⁶ As recent evidence in mice showed an effect of plasma cells on Tfh cell differentiation,^{83,84} it would also be important to evaluate the impact of plasma cells on Tfh cells in humans and during HIV-1 infection.

Follicular regulatory T cells during HIV-1 infection

Germinal centre reaction needs to be highly regulated to prevent the development of systemic autoimmune diseases, chronic inflammation, allergic responses and B-cell malignancies.^{85,86} Recent advances in the field have revealed specialized subsets of T cells necessary for the control of B-cell responses in the follicle. These cells are called follicular regulatory T cells (Tfr) and share phenotypic characteristics with Tfh and conventional regulatory T (Treg) cells but are distinct from both. The Tfr cells originate from natural Treg precursors, unlike Tfh cells, which originate from naive CD4⁺ T cells. Tfr cells also differ from Tfh cells by expressing forkhead box P3 (FoxP3) and B lymphocyte induced maturation protein 1 (Blimp-1). Tfr cells express high levels of CXCR5 (which directs them to the GC), PD-1 and inducible T-cell co-stimulator, and also Bcl6 but at lower level than Tfh cells.⁸⁷ Importantly, Tfr cells potently suppress both Tfh and B cells in the GC reaction (Fig. 1).^{88–90} After initial imprinting by DCs, Tfr cells either leave the LN and enter the circulation destined to become a memory-like Tfr cell, or migrate to the B-cell zone to become effector Tfr cells that suppress Tfh and GC B cells.⁹¹

Studies on the role of Tfr cells in viral infections have started to emerge. In response to influenza virus or LCMV infection, the percentage of Tfr cells contained

within the CD4⁺ CXCR5⁺ gate in lymphoid organs corresponds approximately to 20–30% upon immunization. In contrast, the Tfr-cell percentage drops to 6–8% in lung-draining LNs after influenza virus infection or in the spleen after LCMV infection.⁹¹ Increased Tfr cell numbers were seen also during chronic hepatitis B and hepatitis C virus infection in humans.⁹² Tfr cell expansion seems to be a feature of many chronic viral infections as Tfr frequency appeared to increase in the spleens of chronically HIV-infected untreated individuals.⁹³ In a more recent study, however, it has been shown that Tfr cell numbers may actually decrease in SIV infection.⁹⁴ The discrepancies in these findings might be due to the different gating strategies used to identify Tfh and Tfr cells.

The capacity of Tfr cells to suppress Tfh or B cells during HIV or SIV infection is still unclear but it has been reported that Tfr cells suppress Tfh-cell activation as well as IL-21 and IL-4 production in *in vitro* experiments.⁹⁵ In SIV infection studies, greater avidity of anti-gp120 antibodies correlated with lower frequencies of Tfr cells,⁹⁴ suggesting that during chronic infection Tfr cells may inhibit somatic hypermutation of B cells. Altogether, these data demonstrate an important role for Tfr cells in controlling antibody production during viral infection. More direct experiments are needed to assess the suppressive capacity of Tfr cells in B-cell responses.

As mentioned above, Tfh cells serve as the main reservoir for HIV or SIV.²³ Recent studies reported that Tfr cells can also be infected with HIV or SIV, possibly due to CXCR4 or CCR5 expression on these cells, and blockade of these chemokine receptors inhibited HIV infection of these cells *in vitro*.^{15,94,95} Hence, Tfr cells (as well as Tfh cells) may influence HIV and SIV infections by harbouring virus as well as by regulating B-cell responses.

More recently, another CXCR5⁺ T-cell subset that migrates to the GC and plays an important role in eradicating infected Tfh cells, has been reported.^{96,97} These cells are called “follicular cytotoxic T cells” (Tfc cells) and exhibit high expression of molecules linked to memory development such as CD62L, IL-7 receptor and T-cell-specific transcription factor 1, and low expression of granzymes and perforin relative to that of conventional cytotoxic T cells. The Tfc cells are able to control infections in B-cell follicles and their lack results in exaggerated infection (Fig. 1).⁹⁷ HIV-specific CXCR5⁺ CD8⁺ T-cell numbers were inversely correlated with viral load in HIV-infected patients.^{96,97} Similar data have been reported in SIV-infected animals.^{98,99} Hence, understanding how to direct the differentiation and function of Tfc cells might help in the design of new strategies for eliminating HIV reservoirs.

Conclusion

The Tfh cells are central to mount protective humoral responses against HIV-1, as has recently been confirmed

in an SIV model.¹⁰⁰ The recent discovery of Tfr cells has changed our view about how antibody responses are regulated, which will help in the design of new strategies for controlling humoral immune responses. In light of the recent findings on passive immunotherapy by using broadly neutralizing antibodies that can boost host immunity to HIV-1,¹⁰¹ the impact of such immune interventions on DC priming, and Tfh and Tfr cell functions should be considered. Uncovering the molecular players necessary for Tfh differentiation may help in the design of innovative vaccines and curative strategies against HIV-1.

Disclosure

The authors declare that they have no competing interests.

References

- Halper-Stromberg A, Nussenzweig MC, Davey R, Rothenberger M, Walker L, Wu X *et al.* Towards HIV-1 remission: potential roles for broadly neutralizing antibodies. *J Clin Invest* 2016; **126**:415–23.
- Amu S, Ruffin N, Rethi B, Chioldi F. Impairment of B-cell functions during HIV-1 infection. *AIDS* 2013; **27**:2323–34.
- Crotty S. T follicular helper cell differentiation, function, and roles in disease. *Immunity* 2014; **41**:529–42.
- Wali S, Sahoo A, Puri S, Alekseev A, Nurieva R. Insights into the development and regulation of T follicular helper cells. *Cytokine* 2016; **87**:9–19.
- Qi H. T follicular helper cells in space-time. *Nat Rev Immunol* 2016; **16**:612–25.
- Read KA, Powell MD, Oestreich KJ. T follicular helper cell programming by cytokine-mediated events. *Immunology* 2016; **149**:253–61.
- Embretson J, Zupancic M, Ribas JL, Burke A, Racz P, Tenner-Racz K *et al.* Massive covert infection of helper T lymphocytes and macrophages by HIV during the incubation period of AIDS. *Nature* 1993; **362**:359–62.
- Pantaleo G, Graziosi C, Butini L, Pizzo PA, Schnittman SM, Kotler DP *et al.* Lymphoid organs function as major reservoirs for human immunodeficiency virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991; **88**:9838–42.
- Pantaleo G, Graziosi C, Demarest JF, Butini L, Montroni M, Fox CH *et al.* HIV infection is active and progressive in lymphoid tissue during the clinically latent stage of disease. *Nature* 1993; **362**:355–8.
- Schacker T, Little S, Connick E, Gebhard K, Zhang ZQ, Krieger J *et al.* Productive infection of T cells in lymphoid tissues during primary and early human immunodeficiency virus infection. *J Infect Dis* 2001; **183**:555–62.
- Moukambi F, Rabezanahary H, Rodrigues V, Racine G, Robitaille L, Krust B *et al.* Early loss of splenic Tfh cells in SIV-infected rhesus macaques. *PLoS Pathog* 2015; **11**: e1005287.
- Lindqvist M, van Lunzen J, Soghoian DZ, Kuhl BD, Ransinghe S, Kranias G *et al.* Expansion of HIV-specific T follicular helper cells in chronic HIV infection. *J Clin Invest* 2012; **122**:3271–80.
- Perreau M, Savoye A-L, De Grignis E, Corpataux J-M, Cubas R, Haddad EK *et al.* Follicular helper T cells serve as the major CD4 T cell compartment for HIV-1 infection, replication, and production. *J Exp Med* 2013; **210**:143–56.
- Xu Y, Weatherall C, Bailey M, Alcantara S, De Rose R, Estaquier J *et al.* Simian immunodeficiency virus infects follicular helper CD4 T cells in lymphoid tissues during pathogenic infection of pigtail macaques. *J Virol* 2013; **87**:3760–73.
- Chowdhury A, Del Rio Estrada PM, Del Rio PME, Sharp GK, Tribble RP, Amara RR *et al.* Decreased T follicular regulatory cell/T follicular helper cell (TFH) in simian immunodeficiency virus-infected rhesus macaques may contribute to accumulation of TFH in chronic infection. *J Immunol* 2015; **195**:3237–47.
- Cubas RA, Mudd JC, Savoye A-L, Perreau M, van Grevenynghe J, Metcalf T *et al.* Inadequate T follicular cell help impairs B cell immunity during HIV infection. *Nat Med* 2013; **19**:494–9.
- Mylvaganam GH, Velu V, Hong J-J, Sadagopal S, Kwa S, Basu R *et al.* Diminished viral control during simian immunodeficiency virus infection is associated with aberrant PD-1hi CD4 T cell enrichment in the lymphoid follicles of the rectal mucosa. *J Immunol* 2014; **193**:4527–36.
- Petrovas C, Yamamoto T, Gerner MY, Boswell KL, Wloka K, Smith EC *et al.* CD4 T follicular helper cell dynamics during SIV infection. *J Clin Invest* 2012; **122**:3281–94.
- Xu H, Wang X, Malam N, Lackner AA, Veazey RS. Persistent simian immunodeficiency virus infection causes ultimate depletion of follicular Th cells in AIDS. *J Immunol* 2015; **195**:4351–7.
- Vázquez N, Rekka S, Gliozzi M, Feng CG, Amarnath S, Orenstein JM *et al.* Modulation of innate host factors by Mycobacterium avium complex in human macrophages includes interleukin 17. *J Infect Dis* 2012; **206**:1206–17.
- Ruffin N, Brezar V, Ayinde D, Lefebvre C, Schulze Zur Wiesch J, van Lunzen J *et al.* Low SAMHD1 expression following T-cell activation and proliferation renders CD4+ T cells susceptible to HIV-1. *AIDS* 2015; **29**:519–30.
- Zaunders J, Danta M, Bailey M, Mak G, Marks K, Seddiki N *et al.* CD4+ T follicular helper and IgA+ B cell numbers in gut biopsies from HIV-infected subjects on antiretroviral therapy are similar to HIV-uninfected individuals. *Front Immunol* 2016; **7**:438.
- Miles B, Connick E. TFH in HIV latency and as sources of replication-competent virus. *Trends Microbiol* 2016; **24**:338–44.
- Kohler SL, Pham MN, Folkvord JM, Arends T, Miller SM, Miles B *et al.* Germinal center T follicular helper cells are highly permissive to HIV-1 and alter their phenotype during virus replication. *J Immunol* 2016; **196**:2711–22.
- Ballana E, Esté JA. SAMHD1: at the crossroads of cell proliferation, immune responses, and virus restriction. *Trends Microbiol* 2015; **23**:680–92.
- Avery DT, Deenick EK, Ma CS, Suryani S, Simpson N, Chew GY *et al.* B cell-intrinsic signaling through IL-21 receptor and STAT3 is required for establishing long-lived antibody responses in humans. *J Exp Med* 2010; **207**:155–71.
- Ozaki K, Spolski R, Feng CG, Qi C-F, Cheng J, Sher A *et al.* A critical role for IL-21 in regulating immunoglobulin production. *Science* 2002; **298**:1630–4.
- Velu V, Mylvaganam GH, Gangadhara S, Hong JJ, Iyer SS, Gumber S *et al.* Induction of Th1-biased T follicular helper (Tfh) cells in lymphoid tissues during chronic simian immunodeficiency virus infection defines functionally distinct germinal center Tfh cells. *J Immunol* 2016; **197**:1832–42.
- Ma CS, Deenick EK. Human T follicular helper (Tfh) cells and disease. *Immunol Cell Biol* 2014; **92**:64–71.
- Morita R, Schmitt N, Bentebibel S-E, Ranganathan R, Bourdery L, Zurawski G *et al.* Human blood CXCR5+CD4+ T cells are counterparts of T follicular cells and contain specific subsets that differentially support antibody secretion. *Immunity* 2011; **34**:108–21.
- Ferretti E, Di Carlo E, Ognio E, Guarnotta C, Bertoni F, Corcione A *et al.* Interleukin-17A promotes the growth of human germinal center derived non-Hodgkin B cell lymphoma. *Oncotarget* 2015; **4**:e1030560.
- Boswell KL, Paris R, Boritz E, Ambrozak D, Yamamoto T, Darko S *et al.* Loss of circulating CD4 T cells with B cell helper function during chronic HIV infection. *PLoS Pathog* 2014; **10**:e1003853.
- Ahmed Z, Kawamura T, Shimada S, Piguet V. The role of human dendritic cells in HIV-1 infection. *J Invest Dermatol* 2015; **135**:1225–33.
- Silvin A, Manel N. Innate immune sensing of HIV infection. *Curr Opin Immunol* 2015; **32**:54–60.
- Ma CS, Deenick EK, Batten M, Tangye SG. The origins, function, and regulation of T follicular helper cells. *J Exp Med* 2012; **209**:1241–53.
- Ueno H, Bancheau J, Vinuesa CG. Pathophysiology of T follicular helper cells in humans and mice. *Nat Immunol* 2015; **16**:142–52.
- Schmitt N, Morita R, Bourdery L, Bentebibel SE, Zurawski SM, Bancheau J *et al.* Human dendritic cells induce the differentiation of interleukin-21-producing T follicular helper-like cells through interleukin-12. *Immunity* 2009; **31**:158–69.
- Chakarov S, Fazilleau N, Baldrige J, Crane R, Bancheau J, Steinman R *et al.* Monocyte-derived dendritic cells promote T follicular helper cell differentiation. *EMBO Mol Med* 2014; **6**:590–603.
- Schmitt N, Liu Y, Bentebibel S-E, Munagala I, Bourdery L, Venuprasad K *et al.* The cytokine TGF- β co-opts signaling via STAT3-STAT4 to promote the differentiation of human TFH cells. *Nat Immunol* 2014; **15**:856–65.
- Gringhuis SI, Kaptein TM, Wevers BA, van der Vliet M, Klaver EJ, van Die I *et al.* Fucose-based PAMPs prime dendritic cells for follicular T helper cell polarization via DC-SIGN-dependent IL-27 production. *Nat Commun* 2014; **5**:5074.
- Rodriguez-Garcia M, Shen Z, Barr FD, Boesch AW, Ackerman ME, Kappes JC *et al.* Dendritic cells from the human female reproductive tract rapidly capture and respond to HIV. *Mucosal Immunol* 2017; **10**:531–44.
- Smed-Sörensen A, Loré K, Vasudevan J, Louder MK, Andersson J, Mascola JR *et al.* Differential susceptibility to human immunodeficiency virus type 1 infection of myeloid and plasmacytoid dendritic cells. *J Virol* 2005; **79**:8861–9.

- 43 Schmidt B, Scott I, Whitmore RG, Foster H, Fujimura S, Schmitz J *et al.* Low-level HIV infection of plasmacytoid dendritic cells: onset of cytopathic effects and cell death after PDC maturation. *Virology* 2004; **329**:280–8.
- 44 Kirchoff F. Immune evasion and counteraction of restriction factors by HIV-1 and other primate lentiviruses. *Cell Host Microbe* 2010; **8**:55–67.
- 45 Huot N, Rasclé P, Garcia-Tellex T, Jacquelin B, Müller-Trutwin M. Innate immune cell responses in non pathogenic versus pathogenic SIV infections. *Curr Opin Virol* 2016; **19**:37–44.
- 46 Doyle T, Goujon C, Malim MH. HIV-1 and interferons: who's interfering with whom? *Nat Rev Microbiol* 2015; **13**:403–13.
- 47 Fonteneau J-F, Larsson M, Beignon A-S, McKenna K, Dasilva I, Amara A *et al.* Human immunodeficiency virus type 1 activates plasmacytoid dendritic cells and concomitantly induces the bystander maturation of myeloid dendritic cells. *J Virol* 2004; **78**:5223–32.
- 48 Izmailova E, Bertley FMN, Huang Q, Makori N, Miller CJ, Young RA *et al.* HIV-1 Tat reprograms immature dendritic cells to express chemoattractants for activated T cells and macrophages. *Nat Med* 2003; **9**:191–7.
- 49 Grassi F, Hosmalin A, McLroy D, Calvez V, Debré P, Autran B. Depletion in blood CD11c-positive dendritic cells from HIV-infected patients. *AIDS* 1999; **13**:759–66.
- 50 Pacanowski J, Kahi S, Baillet M, Lebon P, Deveau C, Goujard C *et al.* Reduced blood CD123+ (lymphoid) and CD11c+ (myeloid) dendritic cell numbers in primary HIV-1 infection. *Blood* 2001; **98**:3016–21.
- 51 Barron MA, Blyveis N, Palmer BE, MaWhinney S, Wilson CC. Influence of plasma viremia on defects in number and immunophenotype of blood dendritic cell subsets in human immunodeficiency virus 1-infected individuals. *J Infect Dis* 2003; **187**:26–37.
- 52 Chehimi J, Campbell DE, Azzoni L, Bacheller D, Papisavvas E, Jerandi G *et al.* Persistent decreases in blood plasmacytoid dendritic cell number and function despite effective highly active antiretroviral therapy and increased blood myeloid dendritic cells in HIV-infected individuals. *J Immunol* 2002; **168**:4796–801.
- 53 Dillon SM, Robertson KB, Pan SC, Mawhinney S, Meditz AL, Folkvord JM *et al.* Plasmacytoid and myeloid dendritic cells with a partial activation phenotype accumulate in lymphoid tissue during asymptomatic chronic HIV-1 infection. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2008; **48**:1–12.
- 54 Carranza P, Del Río Estrada PM, Díaz Rivera D, Ablanedo-Terrazas Y, Reyes-Terán G. Lymph nodes from HIV-infected individuals harbor mature dendritic cells and increased numbers of PD-L1+ conventional dendritic cells. *Hum Immunol* 2016; **77**:584–93.
- 55 Soumelis V, Scott L, Gheyas F, Bouhour D, Cozon G, Cotte L *et al.* Depletion of circulating natural type 1 interferon-producing cells in HIV-infected AIDS patients. *Blood* 2001; **98**:906–12.
- 56 Donaghy H, Pozniak A, Gazzard B, Qazi N, Gilmour J, Gotch F *et al.* Brief report loss of blood CD11c⁺ myeloid and CD11c⁺ plasmacytoid dendritic cells in patients with HIV-1 infection correlates with HIV-1 RNA virus load. *Blood* 2016; **98**:2574–7.
- 57 Almeida M, Cordero M, Almeida J, Orfao A. Different subsets of peripheral blood dendritic cells show distinct phenotypic and functional abnormalities in HIV-1 infection. *AIDS* 2005; **19**:261–71.
- 58 Finke JS, Shodell M, Shah K, Siegal FP, Steinman RM. Dendritic cell numbers in the blood of HIV-1 infected patients before and after changes in antiretroviral therapy. *J Clin Immunol* 2004; **24**:647–52.
- 59 Schmidt B, Fujimura SH, Martin JN, Levy JA. Variations in plasmacytoid dendritic cell (PDC) and myeloid dendritic cell (MDC) levels in HIV-infected subjects on and off antiretroviral therapy. *J Clin Immunol* 2006; **26**:55–64.
- 60 Malleret B, Karlsson I, Manéglier B, Brochard P, Delache B, Andrieu T *et al.* Effect of SIVmac infection on plasmacytoid and CD11c⁺ myeloid dendritic cells in cynomolgus macaques. *Immunology* 2008; **124**:223–33.
- 61 Brown KN, Trichel A, Barratt-Boyes SM. Parallel loss of myeloid and plasmacytoid dendritic cells from blood and lymphoid tissue in simian AIDS. *J Immunol* 2007; **178**:6958–67.
- 62 Dutertre C-A, Jourdain J-P, Rancez M, Amraoui S, Fossum E, Bogen B *et al.* TLR3-responsive, XCR1+, CD141(BDCA-3)+/CD8 α + equivalent dendritic cells uncovered in healthy and simian immunodeficiency virus-infected rhesus macaques. *J Immunol* 2014; **192**:4697–708.
- 63 Cameron PU, Forsum U, Tepler H, Graneli-Piperno A, Steinman RM. During HIV-1 infection most blood dendritic cells are not productively infected and can induce allogeneic CD4+ T cells clonal expansion. *Clin Exp Immunol* 1992; **88**:226–36.
- 64 Feldman SB, Milone MC, Kloser P, Fitzgerald-Bocarsly P. Functional deficiencies in two distinct interferon alpha-producing cell populations in peripheral blood mononuclear cells from human immunodeficiency virus seropositive patients. *J Leukoc Biol* 1995; **57**:214–20.
- 65 Swan ZD, Wonderlich ER, Barratt-Boyes SM. Macrophage accumulation in gut mucosa differentiates AIDS from chronic SIV infection in rhesus macaques. *Eur J Immunol* 2016; **46**:446–54.
- 66 Fousat A, Bouchet-delbos L, Berrebi D, Durand-gasselín I, Hermine AC, Krzysiek R *et al.* Deregulation of the expression of the fractalkine / fractalkine receptor complex in HIV-1 – infected patients. *Infection* 2001; **98**:1678–86.
- 67 Dave B, Kaplan J, Gautam S, Bhargava P. Plasmacytoid dendritic cells in lymph nodes of patients with human immunodeficiency virus. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2012; **20**:566–72.
- 68 Wonderlich ER, Wu W-C, Normolle DP, Barratt-Boyes SM. Macrophages and myeloid dendritic cells lose T cell-stimulating function in simian immunodeficiency virus infection associated with diminished IL-12 and IFN- α production. *J Immunol* 2015; **195**:3284–92.
- 69 Liang F, Bond E, Sandgren KJ, Smed-Sörensen A, Rangaka MX, Lange C *et al.* Dendritic cell recruitment in response to skin antigen tests in HIV-1-infected individuals correlates with the level of T-cell infiltration. *AIDS* 2013; **27**:1071–80.
- 70 Collin M, McGovern N, Haniffa M. Human dendritic cell subsets. *Immunology* 2013; **140**:22–30.
- 71 Nakayamada S, Poholek AC, Lu KT, Takahashi H, Kato M, Iwata S *et al.* Type I IFN induces binding of STAT1 to Bcl6: divergent roles of STAT family transcription factors in the T follicular helper cell genetic program. *J Immunol* 2014; **192**:2156–66.
- 72 Snell LM, Osokine I, Yamada DH, De la Fuente JR, Elsaesser HJ, Brooks DG *et al.* Overcoming CD4 Th1 cell fate restrictions to sustain antiviral CD8 T cells and control persistent virus infection. *Cell Rep* 2016; **16**:3286–96.
- 73 Sannicelli S, Kuka M, Di Lucia P, de Oya NJ, De Giovanni M, Fioravanti J *et al.* Inflammatory monocytes hinder antiviral B cell responses. *Sci Immunol* 2016; **1**: eaah6789.
- 74 Fallet B, Narr K, Ertuna YI, Remy M, Sommerstein R, Cornille K *et al.* Interferon-driven deletion of antiviral B cells at the onset of chronic infection. *Sci Immunol* 2016; **1**: eaah6817.
- 75 Choi YS, Eto D, Yang JA, Lao C, Crotty S. Cutting edge: STAT1 is required for IL-6-mediated Bcl6 induction for early follicular helper cell differentiation. *J Immunol* 2013; **190**:3049–53.
- 76 Nilsson J, Boasso A, Velilla PA, Zhang R, Vaccari M, Franchini G *et al.* HIV-1-driven regulatory T-cell accumulation in lymphoid tissues is associated with disease progression in HIV/AIDS. *Blood* 2006; **108**:3808–17.
- 77 Estes JD. Pathobiology of HIV/SIV-associated changes in secondary lymphoid tissues. *Immunol Rev* 2013; **254**:65–77.
- 78 Velu V, Shetty RD, Larsson M, Shankar EM. Role of PD-1 co-inhibitory pathway in HIV infection and potential therapeutic options. *Retrovirology* 2015; **12**:14.
- 79 Pallikkuth S, Rogers K, Villinger F, Dosterii M, Vaccari M, Franchini G *et al.* Interleukin-21 administration to rhesus macaques chronically infected with simian immunodeficiency virus increases cytotoxic effector molecules in T cells and NK cells and enhances B cell function without increasing immune activation or viral replication. *Vaccine* 2011; **29**:9229–38.
- 80 Ruffin N, Thang PH, Rethi B, Nilsson A, Chiodi F. The Impact of Inflammation and Immune Activation on B Cell Differentiation during HIV-1 Infection. *Front Immunol* 2012; **2**:90.
- 81 Alòs L, Navarrete P, Morente V, Garcia F, Garrido M, Plana M *et al.* Immunoarchitecture of lymphoid tissue in HIV-infection during antiretroviral therapy correlates with viral persistence. *Mod Pathol* 2005; **18**:127–36.
- 82 Macías J, Japon MA, Leal M, Sáez C, Pineda JA, Segura DI *et al.* Structural normalization of the lymphoid tissue in asymptomatic HIV-infected patients after 48 weeks of potent antiretroviral therapy. *AIDS* 2001; **15**:2371–8.
- 83 Jang E, Cho WS, Oh Y-K, Cho M-L, Kim JM, Paik D-J *et al.* Splenic long-lived plasma cells promote the development of follicular helper T cells during autoimmune responses. *J Immunol* 2016; **196**:1026–35.
- 84 Pelletier N, McHeyzer-Williams LJ, Wong KA, Urich E, Fazilleau N, McHeyzer-Williams MG. Plasma cells negatively regulate the follicular helper T cell program. *Nat Immunol* 2010; **11**:1110–8.
- 85 Townsend MJ, Monroe JG, Chan AC. B-cell targeted therapies in human autoimmune diseases: an updated perspective. *Immunol Rev* 2010; **237**:264–83.
- 86 Vinuesa CG, Sanz I, Cook MC. Dysregulation of germinal centres in autoimmune disease. *Nat Rev Immunol* 2009; **9**:845–57.
- 87 Sage PT, Sharpe AH. T follicular regulatory cells in the regulation of B cell responses. *Trends Immunol* 2015; **36**:410–8.
- 88 Chung Y, Tanaka S, Chu F, Nurieva RI, Martinez GJ, Rawal S *et al.* Follicular regulatory T cells expressing Foxp3 and Bcl-6 suppress germinal center reactions. *Nat Med* 2011; **17**:983–8.
- 89 Linterman MA, Pierson W, Lee SK, Kallies A, Kawamoto S, Rayner TF *et al.* Foxp3+ follicular regulatory T cells control the germinal center response. *Nat Med* 2011; **17**:975–82.
- 90 Wollenberg I, Agua-Doce A, Hernández A, Almeida C, Oliveira VG, Faro J *et al.* Regulation of the germinal center reaction by Foxp3+ follicular regulatory T cells. *J Immunol* 2011; **187**:4553–60.

Tfh cell dysfunctions in HIV-1 infection

- 91 Sage PT, Sharpe AH. T follicular regulatory cells. *Immunol Rev* 2016; **271**:246–59.
- 92 Wang L, Qiu J, Yu L, Hu X, Zhao P, Jiang Y. Increased numbers of CD5+CD19+CD1dhighIL-10+ Bregs, CD4+Foxp3+ Tregs, CD4+CXCR5+Foxp3+ follicular regulatory T (TFR) cells in CHB or CHC patients. *J Transl Med* 2014; **12**:251.
- 93 Colineau L, Rouers A, Yamamoto T, Xu Y, Urrutia A, Pham H-P *et al.* HIV-infected spleens present altered follicular helper T cell (Tfh) subsets and skewed B cell maturation. *PLoS ONE* 2015; **10**:e0140978.
- 94 Blackburn MJ, Zhong-Min M, Caccuri F, McKinnon K, Schifanella L, Guan Y *et al.* Regulatory and helper follicular T cells and antibody avidity to simian immunodeficiency virus glycoprotein 120. *J Immunol* 2015; **195**:3227–36.
- 95 Miles B, Miller SM, Folkvord JM, Kimball A, Chamanian M, Meditz AL *et al.* Follicular regulatory T cells impair follicular T helper cells in HIV and SIV infection. *Nat Commun* 2015; **6**:8608.
- 96 He R, Hou S, Liu C, Zhang A, Bai Q, Han M *et al.* Follicular CXCR5-expressing CD8 (+) T cells curtail chronic viral infection. *Nature* 2016; **537**:412–28.
- 97 Leong YA, Chen Y, Ong HS, Wu D, Man K, Deleage C *et al.* CXCR5(+) follicular cytotoxic T cells control viral infection in B cell follicles. *Nat Immunol* 2016; **17**:1187–96.
- 98 Li S, Folkvord JM, Rakasz EG, Abdelaal HM, Wagstaff RK, Kovacs KJ *et al.* Simian immunodeficiency virus-producing cells in follicles are partially suppressed by CD8+ cells in vivo. *J Virol* 2016; **90**:11168–80.
- 99 Miles B, Miller SM, Folkvord JM, Levy DN, Rakasz EG, Skinner PJ *et al.* Follicular regulatory CD8 T cells impair the germinal center response in SIV and ex vivo HIV infection. *PLoS Pathog* 2016; **12**:e1005924.
- 100 Vargas-Inchaustegui DA, Demers A, Shaw JM, Kang G, Ball D, Tuero I *et al.* Vaccine induction of lymph node-resident simian immunodeficiency virus Env-specific T follicular helper cells in rhesus macaques. *J Immunol* 2016; **196**:1700–10.
- 101 Schoofs T, Klein F, Braunschweig M, Kreider EF, Feldmann A, Nogueira L *et al.* HIV-1 therapy with monoclonal antibody 3BNC117 elicits host immune responses against HIV-1. *Science* 2016; **352**:997–1001.

Annexe 4.

Optimisation du protocole d'extraction d'ARN à partir de cellules fixées

Optimisation du protocole d'extraction d'ARN à partir de cellules fixées

Dans l'optique de caractériser la population SAMHD1^{low} au niveau moléculaire (analyse des profils transcriptionnels), une optimisation de protocole d'extraction d'ARN à partir de cellules fixées/perméabilisées (conditions indispensables pour notre population d'intérêt) a été réalisée. En effet, l'étape de fixation/perméabilisation des cellules induit une dégradation majeure de la qualité des ARNs que nous pouvions estimer grâce aux valeurs très basse de RIN (RNA Integrity Number, valeur liée à la présence des ARN ribosomiaux 18S et 28S) obtenues. Afin de réaliser une analyse transcriptomique ou RNA-seq, les valeurs de RIN doivent être $\geq 6-7$.

Dans le but d'améliorer la qualité des ARNs extraits de cellules fixées/perméabilisées, différents kits d'extraction d'ARN, supplémentés de traitements permettant de préserver l'intégrité de l'ARN, ont été comparés. De plus, diverses techniques de fixation/perméabilisation ont été testées. Les rendements en terme de quantité et de qualité des ARNs issus des différentes conditions ont été comparés afin d'établir un protocole final qui permettrait d'obtenir des profils d'ARN ribosomiaux 18S et 28S proches des conditions classiques (cellules fraîches non-fixées).

a. Matériel utilisé pour l'optimisation

a.1. Matériel biologie

Les techniques décrites ci-dessous ont toutes été réalisées en utilisant des cellules provenant de prélèvements frais (prélevés le jour même) de sang de sujets sains de l'EFS, sous forme de tubes de sang EDTA (n=47, 4-5 tubes en moyenne par sujet, ~20ml de sang total/sujet), et sous forme de cônes de cytophérèse (n=14, sang concentré en cellules mononuclées ~10ml de sang concentré/sujet). Les cellules PBMCs de ces sujets ont été fraîchement isolées du sang total par gradient de séparation Ficoll avant d'être utilisées.

a.2. Kit d'extraction d'ARN et techniques de préservation de l'intégrité des ARN

Trois kit différents d'extraction d'ARN du fournisseur Qiagen ont été testés: le « RNeasy Plus Mini kit », le « RNeasy Micro Kit » et le « RNeasy FFPE kit » (conçu spécialement pour les

cellules fixées). Ces kits d'extraction passent par des étapes de lyse cellulaire, d'élimination d'ADN génomique sur colonnes puis d'élution de l'ARN.

- Le « RNeasy Plus mini kit » : Ce kit intègre une purification rapide et pratique de ~100 µg d'ARN avec une élimination efficace de l'ADN génomique. Les lysats cellulaires sont centrifugés à travers des colonnes de spin Eliminator gDNA pour éliminer l'ADN génomique. L'ARN total est ensuite purifié en utilisant des colonnes de spin RNeasy Mini. Ce kit a été testé car il comprend, entre autre, un réactif de stabilisation d'ARN (RNAlater).
- Le « RNeasy Micro Kit » : Comme les cellules SAMHD1^{low} (population cellulaire d'intérêt) sont présentes à de très faibles proportions dans les PBMCs comparé aux deux autres populations cellulaires, le « RNeasy Micro Kit » (capacité de liaison de la colonne de spin de 45 µg d'ARN) a également été testé pour de plus petits échantillons. Ce kit est supplémenté lui aussi d'un stabilisateur d'ARN (RNAlater).
- Le « RNeasy FFPE kit » : Le troisième kit testé est le « RNeasy FFPE kit » spécialement conçu pour purifier l'ARN total des coupes de tissus paraffinées, fixées au formol, ou de suspensions cellulaires fixées/perméabilisées. Le tampon de lyse de ce kit permet de libérer efficacement l'ARN des coupes de tissus et des cellules tout en évitant une dégradation supplémentaire de l'ARN. Le kit utilise également le tampon DNase et le DNase booster pour une élimination optimisée de la contamination par l'ADN génomique. Les colonnes RNeasy MinElute de ce kit permettent une purification de l'ARN total avec des volumes d'élution aussi bas que 10 µl.

De plus, après la fixation/preméabilisation des cellules et avant l'étape d'extraction de l'ARN, les cellules ont subies divers traitements permettant de préserver l'intégrité de l'ARN. Les traitements qui ont notamment été comparés sont :

- Lavage des cellules au PBS 1X « RNase free » (Ambion).
- Lavage des cellules au PBS 1X supplémenté de « RNase Inhibitor » (RNasin Plus RNase Inhibitor, Promega), enzyme inhibitrice de RNase.

- Lavage des cellules dans du « RNAprotect », tampon optimisé de chez Qiagen permettant la conservation de l'ARN dans des conditions optimales et de non dégradation.
- Lavage des cellules au PBS 1X supplémenté de 2% Tryptone (Roth) et 0.1% DEPC (Diethyl pyrocarbonate, roth). Ce buffer a été utilisé à 4°C, après 12h d'agitation à l'abri de la lumière.

Pour chacune des techniques susmentionnées, deux conditions différentes de PBMCs ont été testées :

- PBMCs fixées/perméabilisées (Foxp3/Transcription Factor Staining Buffer Set, Affymetrix eBioscience, protocole détaillé dans la partie « caractérisation phénotypique par cytométrie en flux »).
- PBMCs non-fixées (cellules fraîches, contrôle de condition classique).

A terme, les rendements qualitatifs et quantitatifs des ARNs issus de chaque condition ont été comparés, le but étant de déterminer les conditions apportant le meilleur rendement.

a.3. Conditions de fixation/perméabilisation des cellules

L'étape de fixation/perméabilisation des cellules affecte l'intégrité de l'ARN et induit sa dégradation. Ainsi, différentes conditions de fixation/perméabilisation ont été testées, notamment :

- Le kit de fixation/perméabilisation « Foxp3/Transcription Factor Staining Buffer Set » fourni par Affymetrix eBioscience. Ce kit a été testé à différentes concentrations : à 1X (selon les recommandations du fournisseur) puis après dilution (1/4, 1/6, 1/10).
- Le kit de fixation/perméabilisation « BD Cytfix/Cytoperm » fourni par BD Bioscience.
- Fixation à la paraformaldéhyde (PFA 1%, PFA 4%) et perméabilisation à la Saponine (détergent perméabilisant, concentration de 0.1%).

- Fixation à la paraformaldéhyde (PFA 4%) et perméabilisation au Tween-20 (détergent non ionique, concentré à 0.05%, 0.1% et 0.2%).
- Fixation à la paraformaldéhyde (PFA 4%) et perméabilisation au Triton X-100 (détergent de synthèse perméabilisant, utilisé à 0.1%).
- Fixation à l'éthanol 70%.

Après chacune des différentes étapes de fixation/perméabilisation, des marquages extracellulaire et intracellulaire ont été réalisés sur une partie des PBMCs puis analysés au Cytomètre de Flux LSR II (FACS Becton Dickinson LSR II), afin de contrôler l'efficacité des marquages intra/extracellulaires à l'issue de chaque condition. L'autre partie des PBMCs a servi à l'extraction de l'ARN et au contrôle qualitatif et quantitatif.

a.4. Quantification de l'ARN et contrôle de la qualité

Les ARNs extraits ont été quantifiés par méthode spectrophotométrique à 260 nm (NanoDrop™ 8000, Fisher Scientific, Illkirch Cedex, France). La qualité des ARNs a été vérifiée par une méthode fluorométrique sur puce (Bioanalyzer 2100™, Agilent Technologies, Massy Cedex, France) par utilisation des kit Agilent RNA 6000 Pico kit, Ref 5067-1513 et Agilent RNA 6000 Nano kit, Ref 5067-1511).

b. Détermination des conditions optimales d'extraction d'ARN à partir de cellules fixées

b.1. Choix du Kit d'extraction

De manière générale, les extractions d'ARN réalisées sur des cellules fixées et des cellules non-fixées avec le même kit, ont permis d'obtenir des quantités similaires d'ARN : $\sim 330\text{ng}/10^6$ avec le « RNeasy FFPE kit », $\sim 35\text{ng}/10^6$ avec le « RNeasy Plus mini kit » et $\sim 50\text{ng}/10^6$ avec le « RNeasy Micro Kit ». L'analyse qualitative des ARN, déterminée par la valeur du RIN, a indiqué que les ARNs extraits à partir de cellules fixées, en utilisant les trois kit, étaient tous de mauvaise qualité : RIN=2.36 avec le « RNeasy FFPE kit », RIN=2.3 avec le « RNeasy Plus mini kit » et RIN= 2.5 avec le « RNeasy Micro Kit ». En revanche, les ARNs extraits de cellules non-fixées avec les kits « RNeasy Plus mini kit » et « RNeasy Micro Kit » étaient tous de très bonne qualité (RIN de 8.87 et 8.6 respectivement, conditions contrôle), tandis que

ceux extraits avec le kit « RNeasy FFPE kit » étaient très dégradés (RIN= 2.4) (Figure 1).

La qualité des ARNs extraits à partir de cellules non-fixées avec les kits « RNeasy Plus mini kit » et « RNeasy Micro Kit » a été utilisée comme contrôle positif car elle est représentative des conditions classiques d'extraction utilisés dans le laboratoire. De ce fait, certes le « RNeasy FFPE kit » a permis d'obtenir un meilleur rendement sur des cellules fixées et non-fixées par comparaison avec les deux autres kits, mais la qualité des ARN est très mauvaise.

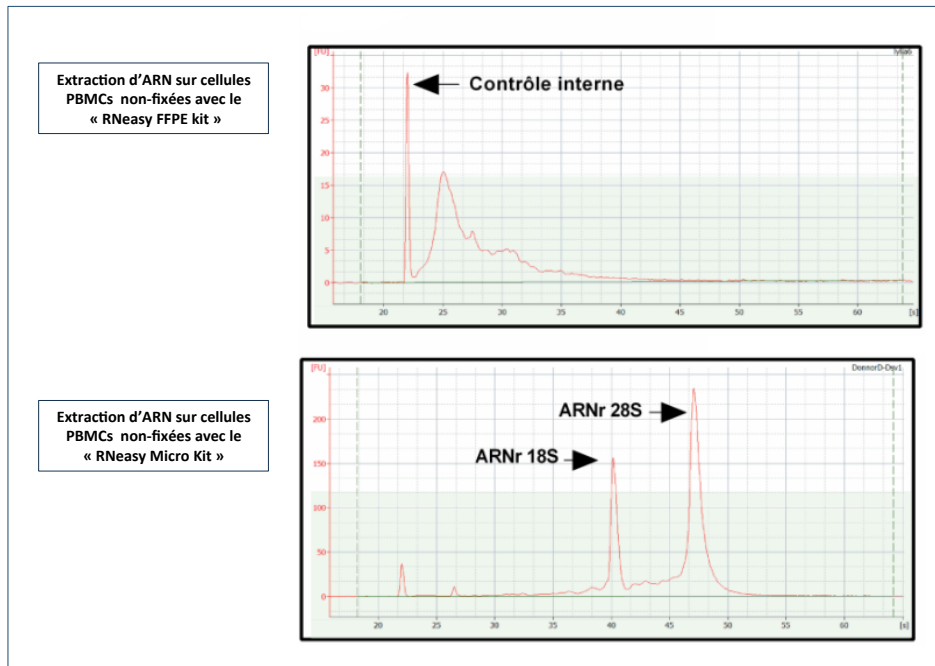


Figure 1. Exemples de profils de qualité d'ARN obtenus après extraction sur cellules PBMCs non-fixées avec les kits « RNeasy FFPE kit » et « RNeasy Micro Kit ». (Haut) Profil de qualité d'ARN extrait à partir de cellules non-fixées avec le kit « RNeasy FFPE kit ». Les ARNr 18S et 28S ne sont pas détectés ce qui reflète une profonde dégradation de l'ARN. (Bas) Profil de qualité d'ARN extrait à partir de cellules fraîches avec le « RNeasy Micro Kit ». Ce cas est représentatif des conditions classiques d'extraction sur des cellules fraîches (non-fixées), avec un RIN \geq 7.

Le « RNeasy Micro Kit » (optimisé pour de petits échantillon) a permis d'obtenir un meilleur rendement sur des cellules fixées comparé au « RNeasy Plus mini kit » (~50ng/10⁶ vs ~35ng/10⁶ respectivement) même si la qualité des ARN n'a pas été améliorée (RIN= 2.5 vs RIN=2.3 respectivement), ce kit a donc été choisi pour le reste des expériences d'optimisation.

b.2. Choix des traitements permettant de préserver l'intégrité de l'ARN

Le lavage des cellules PBMCs fixées avec du PBS 1X « RNase free » n'a pas empêché l'ARN de se dégrader (RIN=2.5) tandis que les traitements au PBS 1X supplémenté de « RNase Inhibitor » et « RNprotect » ont tous les deux permis d'améliorer la qualité des ARNs extraits à partir de cellules fixées (RIN= 4 et RIN= 7 respectivement). Le lavage des cellules fixées au PBS 1X supplémenté de 2% Tryptone et 0.1% DEPC avant l'extraction a lui aussi permis d'améliorer la qualité des ARN (RIN= 4.6) (Figure 2).

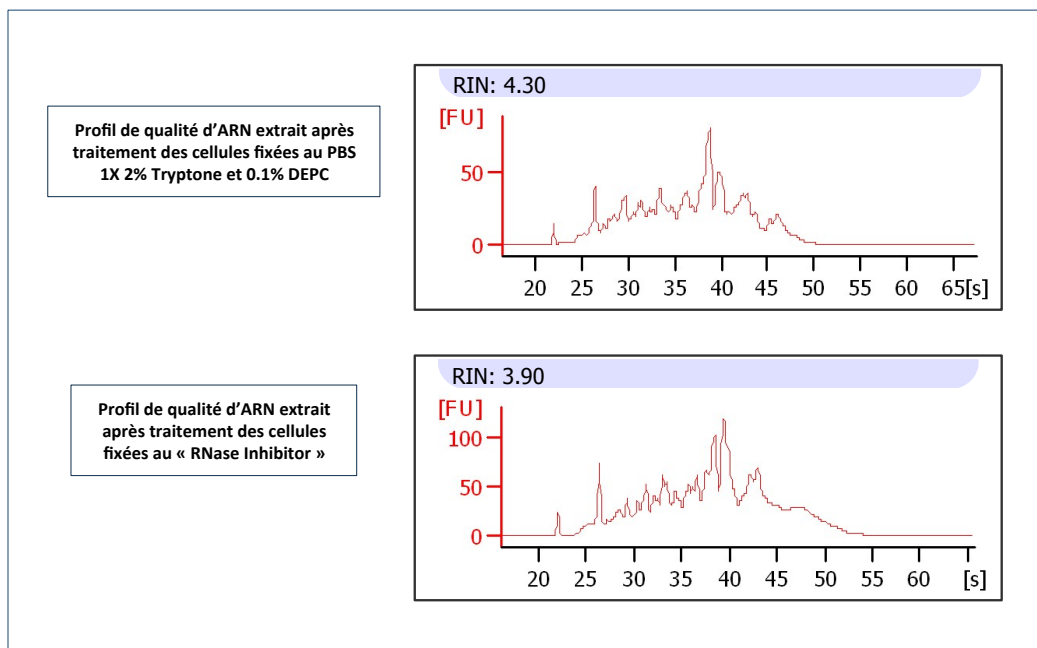


Figure 2. Exemples de profils de qualité d'ARN extraits sur cellules PBMCs fixées traitées au « RNase inhibitor » et au PBS 1X 2% Tryptone 0.1% DEPC. (Haut) Le lavage des cellules fixées au PBS 1X supplémenté de 2% Tryptone et 0.1% DEPC avant l'extraction a permis d'améliorer la qualité des ARN (moyenne RIN= 4.6) et (Bas) le traitement avec « RNase Inhibitor » a amélioré la qualité avec une moyenne de RIN= 4.

Des marquages extracellulaire et intracellulaire ont été réalisés sur une partie des PBMCs traités avec les différentes conditions susmentionnées, puis analysés au Cytomètre de Flux LSR II (FACS Becton Dickinson LSR II). Les analyses FACS ont montré que les cellules qui ont subi le lavage avec le « RNprotect » n'étaient plus détectables (pas de marquage extracellulaire anti-CD3, -CD4 et -CD45RO), rendant impossible l'étape du tri cellulaire. En revanche, la qualité des marquages n'a pas été affectée après les traitements avec « RNase Inhibitor » et PBS 1X supplémenté de 2% Tryptone et 0.1% DEPC. Ces deux conditions ont donc été maintenues pour l'élaboration du protocole.

b.3. Choix des conditions de fixation/perméabilisation

Les conditions de fixation/perméabilisation que nous avons testé ont été évaluées sur deux plan : le premier est l'amélioration de la qualité des ARNs, le second est la qualité des marquages par cytométrie en flux en vue du tri cellulaire.

Les ARNs extraits de cellules fixées avec les kits « Foxp3/Transcription Factor Staining Buffer Set », « BD Cytotfix/Cytoperm » et avec l'éthanol 70% étaient tous de mauvaise qualité avec des RIN compris entre 2 et 2.5. La dilution du buffer de fixation du kit « Foxp3/Transcription Factor Staining Buffer Set » au 1/4, 1/6 ou 1/10 n'a en rien amélioré la qualité des ARNs, quelque soit la dilution utilisée (RIN= 2.5, RIN=2.7 et RIN=2.5 respectivement) (Figure 3).

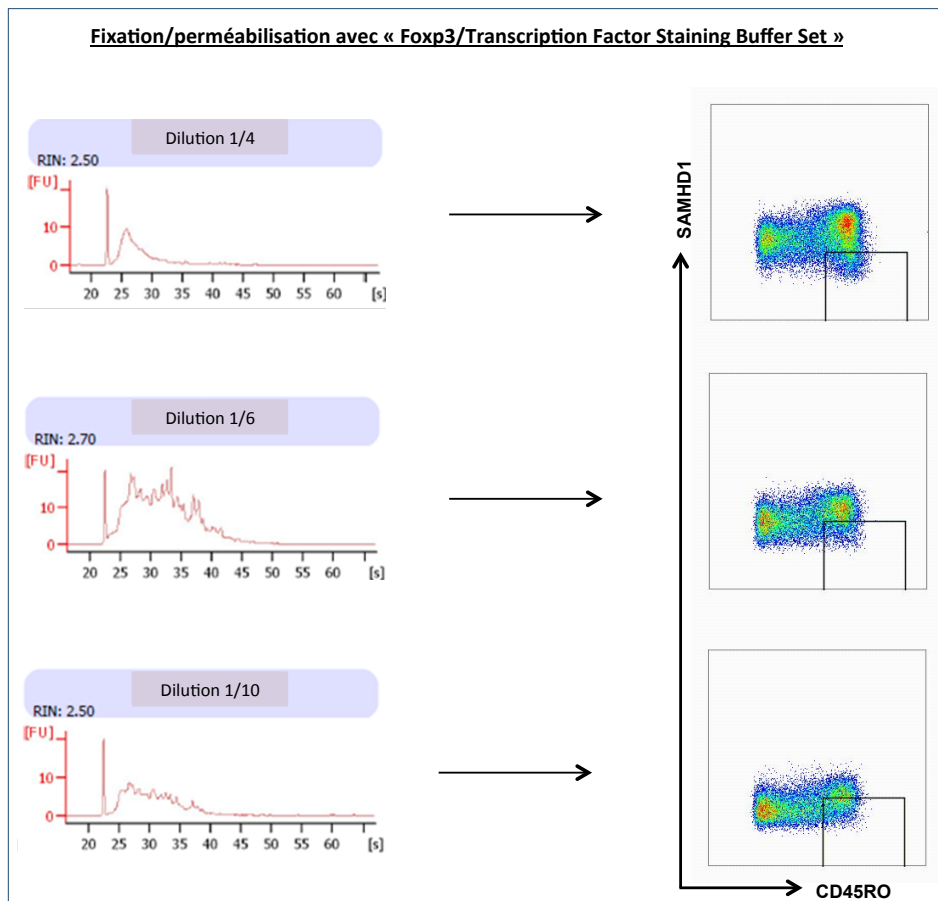


Figure 3. Exemples de profils de qualité d'ARN et de plot représentatifs de marquage par cytométrie en flux de cellules PBMCs fixées avec « Foxp3/Transcription Factor Staining Buffer Set ». Quelque soit la dilution du buffer de fixation de ce kit, il n'y pas d'amélioration de la qualité de l'ARN. Plus le buffer de fixation est dilué, moins la fixation/perméabilisation est efficace et moins le marquage intracellulaire est optimal.

Les résultats ont également montré que plus le tompon de fixation est dilué, moins le marquage intracellulaire est optimal, ce qui suggère une baisse d'efficacité de la fixation/perméabilisation (Figure 11).

La fixation/perméabilisation avec la PFA 4% Saponine 0.1% a permit d'obtenir un marquage intracellulaire optimal pour le marqueur SAMHD1 comparé à la condition avec PFA 1% Saponine 0.1%. Néanmoins, aucune de ces deux conditions n'a permit d'améliorer la qualité de l'ARN (RIN=2.5).

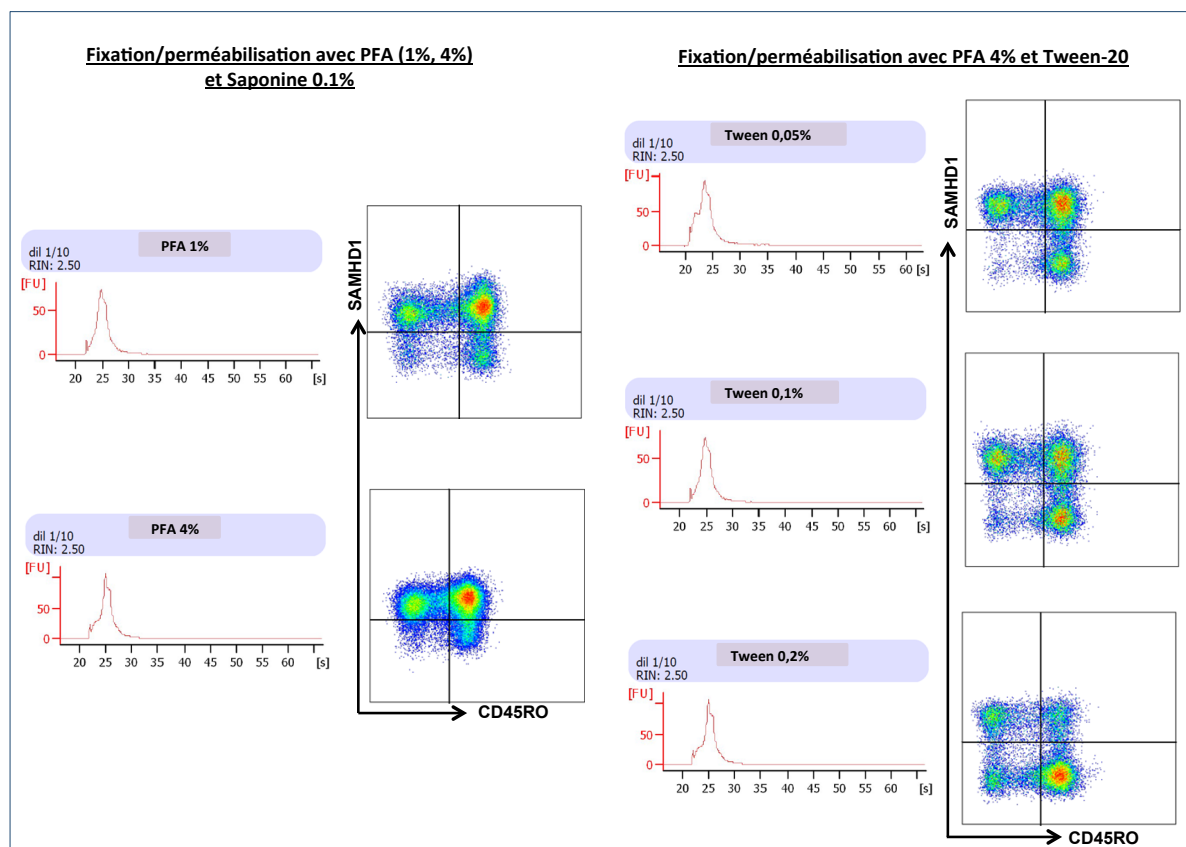


Figure 4. Exemples de profils de qualité d'ARN et de plot représentatifs de marquage par cytométrie en flux de cellules PBMCs fixées avec différentes conditions. (Gauche) La fixation/ perméabilisation avec la PFA (1% ou 4%) + saponine 0.1% n'améliore pas la qualité de l'ARN. Une fixation à 4% de PFA est optimale pour un marquage intracellulaire. **(Droite)** La perméabilisation au Tween-20 baisse l'efficacité du marquage intracellulaire et n'améliore pas la qualité de l'ARN.

L'association de PFA 4% et Tween-20 (concentré à 0.05%, 0.1% et 0.2%) n'a pas permis une fixation/perméabilisation efficace pour un marquage intracellulaire et n'a, elle aussi, pas amélioré la qualité des ARNs. Les mêmes observations ont été notées pour une fixation à la PFA 4% associée au Triton-X100 (Figure 4).

Bien qu'aucune condition de fixation/perméabilisation n'a permis d'améliorer la qualité des ARN, des marquages intracellulaires optimaux ont été observés dans les conditions de fixation/perméabilisation avec le « Foxp3/Transcription Factor Staining Buffer Set », la PFA 4% + Saponine 0.1% et l'éthanol 70%.

c. Protocole final d'extraction d'ARN de bonne qualité à partir de cellules fixées

En nous basant sur les résultats de comparaison des différentes techniques d'extraction d'ARN, de traitement de cellules et de fixation/perméabilisation, et en essayant divers combinaisons de conditions, un protocole d'extraction d'ARN avec des valeurs de RIN comprises entre 3.7 et 5.8, à pu être mit en place (Figure 5).

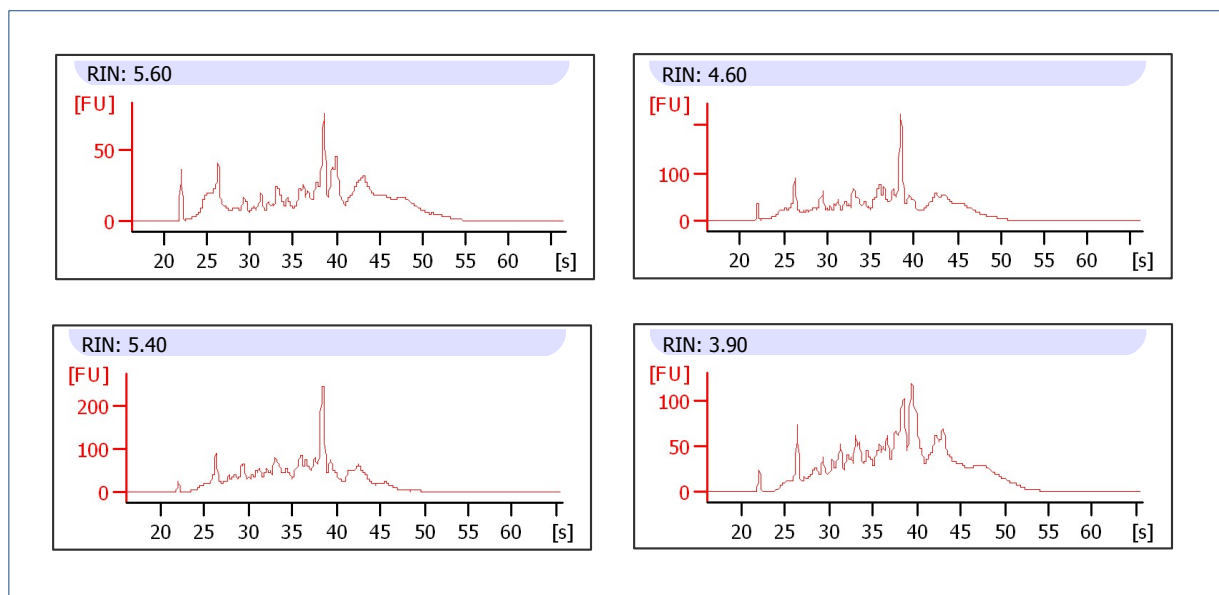


Figure 5. Exemples représentatifs de profils de qualité d'ARN extraits de cellules fixées puis triées suivant les étapes du protocole optimisé. Ce protocole a permis d'améliorer la qualité des ARN qui sont passées d'un RIN=2 à un RIN compris entre 3.7 et 5.8.

Ce protocole réunit les conditions suivantes : lavage dans du milieu PBS 1X supplémenté de 2% Tryptone et 0.1% DEPC et traitement avec « RNase Inhibitor », fixation à l'éthanol 70% et extraction d'ARN par utilisation du « RNeasy Micro Kit ». Les différentes étapes de ce protocole sont détaillées dans la partie « Expression génique et RNA-seq » du chapitre « Matériel et méthodes ».

Annexe 5.

Figures supplémentaires

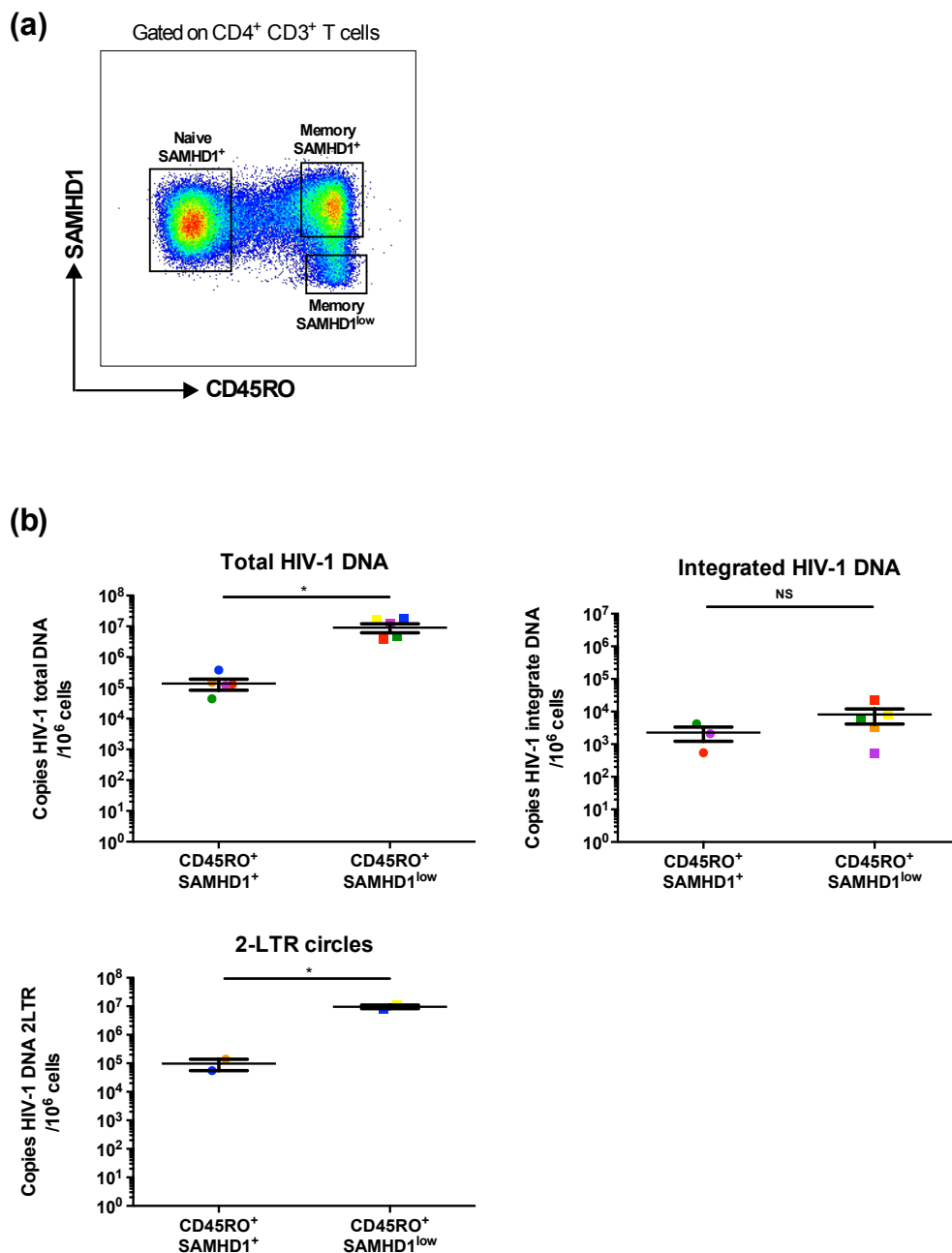


Figure supplémentaire 1. Les lymphocytes T CD4⁺ mémoires SAMHD1^{low} contiennent plus d'ADN-VIH-1 total et 2LTR comparés aux lymphocytes T CD4⁺ mémoires SAMHD1⁺. Le sang périphérique de 6 sujets VIH-1+ c-ART+ a été collecté. Les PBMCs ont été marqués avec des anticorps monoclonaux anti-CD3, -CD4, -CD45RO et -SAMHD1 puis les sous-populations T CD4⁺ CD45RO⁺ SAMHD1^{low} et T CD4⁺ CD45RO⁺ SAMHD1⁺ ont été triées par FACS. Les protocoles d'extraction d'ADN et de PCR sont détaillés dans (Munir, Thierry et al. 2013). L'ADN VIH-1 total, intégré et 2LTR ont été quantifiés dans les cellules triées ex vivo par RT-PCR. (a) Stratégie de gating utilisée pour le tri des cellules T CD4⁺ CD45RO⁺ SAMHD1^{low} et T CD4⁺ CD45RO⁺ SAMHD1⁺. (b) Valeurs d'ADN-VIH-1 total, intégré et 2LTR dans les cellules T CD4⁺ CD45RO⁺ SAMHD1^{low} et T CD4⁺ CD45RO⁺ SAMHD1⁺ triées de sujets VIH-1+ c-ART+. *p<0.05, **p<0.01 et ***p<0.001, t-test, one-way ANNOVA suivis du test Bonferroni ont été réalisés.

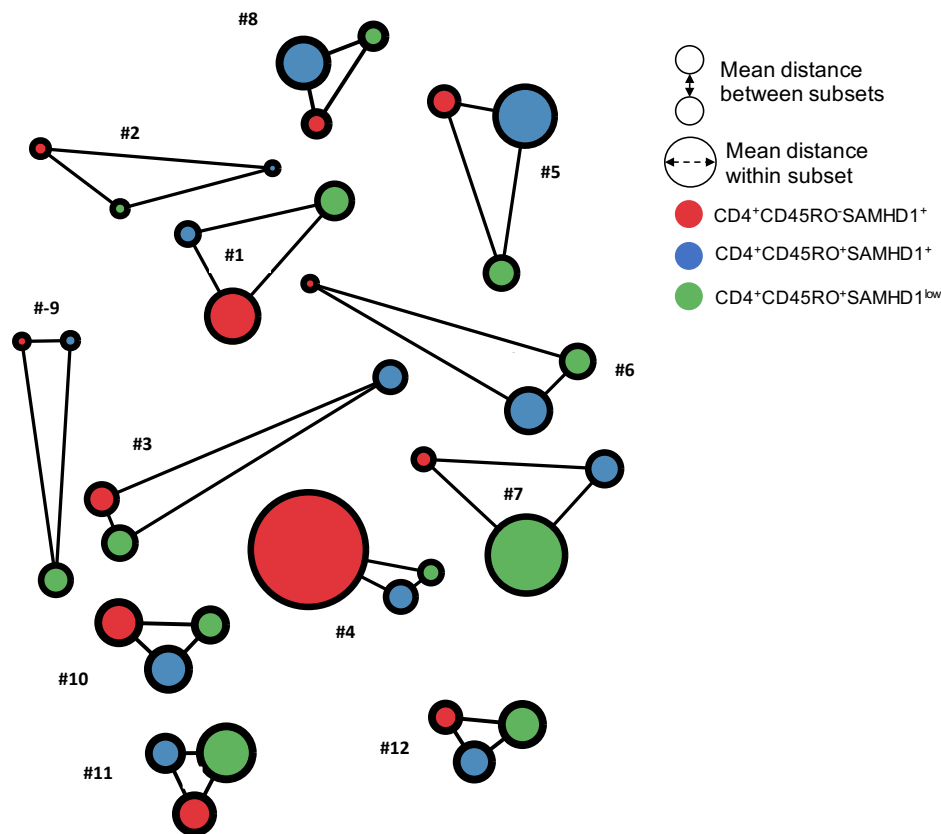


Figure supplémentaire 2. Diversité des haplotypes et variabilité génétique entre l'ADN VIH-1 des sous-populations cellulaires mémoires $CD4^+ CD45RO^+ SAMHD1^{low}$, $CD4^+ CD45RO^+ SAMHD1^+$ et naïves $CD4^+ CD45RO^- SAMHD1^+$ de 12 sujets VIH-1+ c-ART+. La taille des symboles est proportionnelle à la diversité des haplotypes détectés dans chaque sous-population cellulaire. La distance moyenne entre les séquences des sous-populations cellulaires est proportionnelle à la longueur des branches.

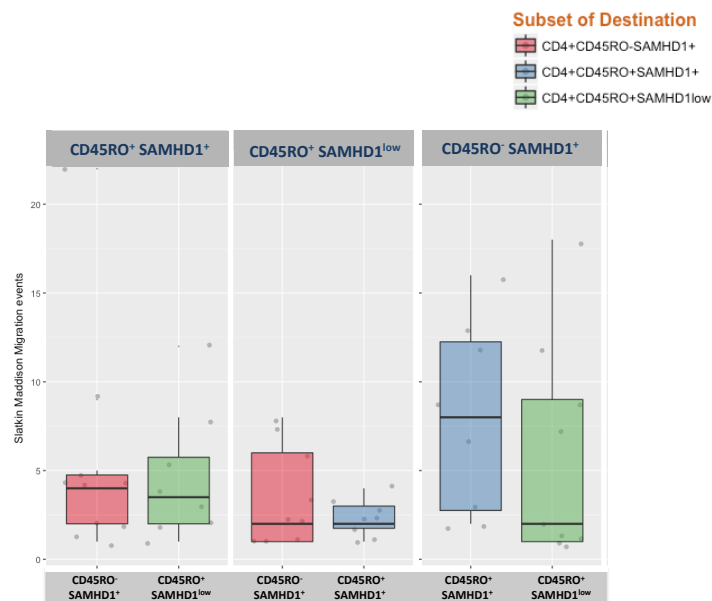


Figure supplémentaire 3. Les événements de migration détectés à partir de chaque sous-ensemble de cellules dans les deux sous-ensembles de destination correspondants.

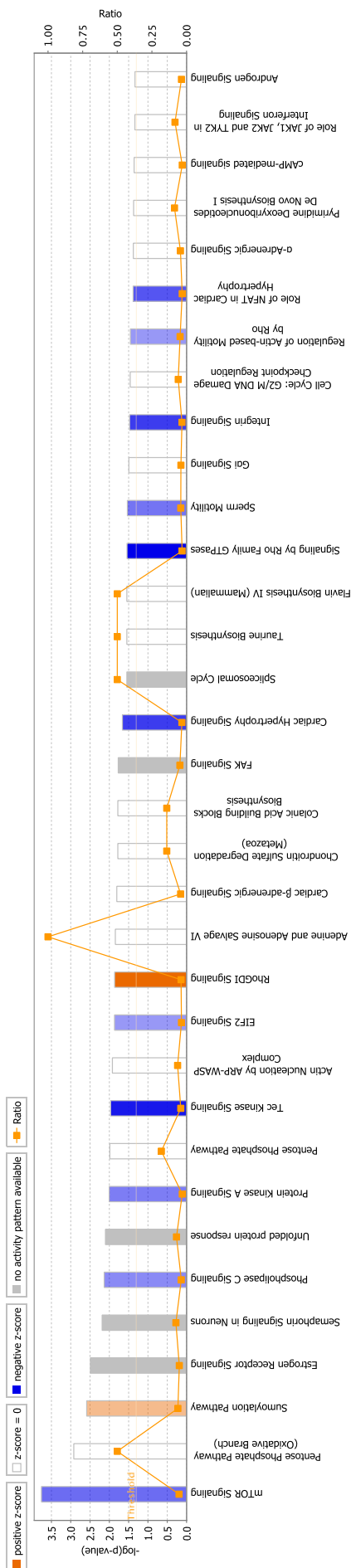


Figure Supplémentaire 4. Voies canoniques impliquées dans l'analyse différentielle des PEG de cellules SAMHD1^{low} et SAMHD1⁺. Voies listées par degré décroissant de significativité, axe des ordonnées. Ratio indiquant le nombre de gènes différentiellement exprimés rapporté au nombre total de gènes de la voie considérée. Les couleurs des histogrammes indiquent le sens probable d'implication de chaque voie (Z-score positif en orange, activation ; Z-score négatif en bleu, inhibition de la voie ; Z-score nul en blanc et Z-score indéterminé en gris).

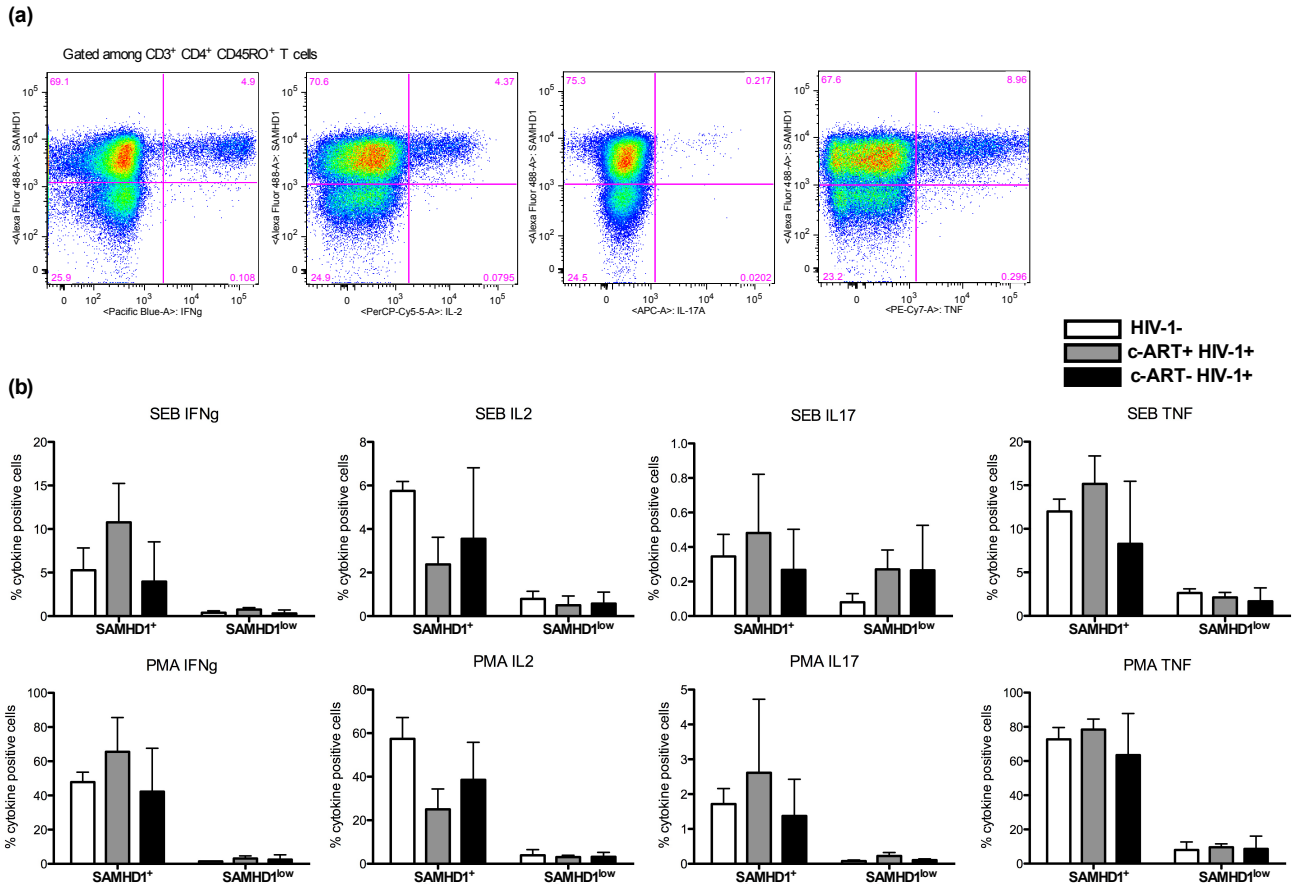


Figure supplémentaire 5. Les cellules mémoires SAMHD1^{low} produisent significativement moins de cytokines comparées aux cellules SAMHD1⁺. Les PBMCs de sujets sains (VIH-1-, n=7), de patients infectés et traités (VIH-1+ c-ART+, n=2) et de patients non traités (n=3) ont été stimulés 24h avec de la SEB ou PMA (50ng/ml) et Ionomycin (2mM) en présence de Monensin, puis marqués avec des anticorps monoclonaux anti-CD3, -CD4, -CD45RO, -IL2, -IL17, -TNF α , -IFN γ et -SAMHD1. (a) Stratégie de gating utilisée pour isoler les lymphocytes T CD4⁺ mémoire (CD45RO⁺) SAMHD1⁺ et SAMHD1^{low} IFN γ ⁺, IL2⁺, IL17⁺ et TNF α ⁺, dans les trois groupes de patients. (b) Proportions de cellules IFN γ ⁺, IL2⁺, IL17⁺ et TNF α ⁺ dans les lymphocytes T CD4⁺ mémoire (CD45RO⁺) SAMHD1⁺ et SAMHD1^{low} dans les trois groupes de patients.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Références bibliographiques

- Abbott, N. J. (1987). "Neurobiology. Glia and the blood-brain barrier." *Nature* **325**(6101): 195.
- Abromson-Leeman, S., R. T. Bronson and M. E. Dorf (2009). "Encephalitogenic T cells that stably express both T-bet and ROR gamma t consistently produce IFN γ but have a spectrum of IL-17 profiles." *J Neuroimmunol* **215**(1-2): 10-24.
- Ackerman, A. L. and P. Cresswell (2004). "Cellular mechanisms governing cross-presentation of exogenous antigens." *Nat Immunol* **5**(7): 678-684.
- Acosta-Rodriguez, E. V., L. Rivino, J. Geginat, D. Jarrossay, M. Gattorno, A. Lanzavecchia, F. Sallusto and G. Napolitani (2007). "Surface phenotype and antigenic specificity of human interleukin 17-producing T helper memory cells." *Nat Immunol* **8**(6): 639-646.
- Aggarwal, S., N. Ghilardi, M. H. Xie, F. J. de Sauvage and A. L. Gurney (2003). "Interleukin-23 promotes a distinct CD4 T cell activation state characterized by the production of interleukin-17." *J Biol Chem* **278**(3): 1910-1914.
- Ahn, J., C. Hao, J. Yan, M. DeLucia, J. Mehrens, C. Wang, A. M. Gronenborn and J. Skowronski (2012). "HIV/simian immunodeficiency virus (SIV) accessory virulence factor Vpx loads the host cell restriction factor SAMHD1 onto the E3 ubiquitin ligase complex CRL4DCAF1." *J Biol Chem* **287**(15): 12550-12558.
- Aicardi, J. and F. Goutieres (1984). "A progressive familial encephalopathy in infancy with calcifications of the basal ganglia and chronic cerebrospinal fluid lymphocytosis." *Ann Neurol* **15**(1): 49-54.
- Allouch, A., A. David, S. M. Amie, H. Lahouassa, L. Chartier, F. Margottin-Goguet, F. Barre-Sinoussi, B. Kim, A. Saez-Cirion and G. Pancino (2013). "p21-mediated RNR2 repression restricts HIV-1 replication in macrophages by inhibiting dNTP biosynthesis pathway." *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**(42): E3997-4006.
- Allouch, A., A. David, S. M. Amie, H. Lahouassa, L. Chartier, F. Margottin-Goguet, F. Barre-Sinoussi, B. Kim, A. Saez-Cirion and G. Pancino (2014). "Reply to Pauls et al.: p21 is a master regulator of HIV replication in macrophages through dNTP synthesis block." *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**(14): E1325-1326.
- Altfeld, M. and M. Gale, Jr. (2015). "Innate immunity against HIV-1 infection." *Nat Immunol* **16**(6): 554-562.
- Altin, J. G. and E. K. Sloan (1997). "The role of CD45 and CD45-associated molecules in T cell activation." *Immunol Cell Biol* **75**(5): 430-445.
- Alvarez, Y., M. Tuen, G. Shen, F. Nawaz, J. Arthos, M. J. Wolff, M. A. Poles and C. E. Hioe (2013). "Preferential HIV infection of CCR6+ Th17 cells is associated with higher levels of virus receptor expression and lack of CCR5 ligands." *J Virol* **87**(19): 10843-10854.
- Amie, S. M., R. A. Bambara and B. Kim (2013). "GTP is the primary activator of the anti-HIV restriction factor SAMHD1." *J Biol Chem* **288**(35): 25001-25006.
- An, P. and C. A. Winkler (2010). "Host genes associated with HIV/AIDS: advances in gene discovery." *Trends Genet* **26**(3): 119-131.
- Ananworanich, J., K. Dube and N. Chomont (2015). "How does the timing of antiretroviral therapy initiation in acute infection affect HIV reservoirs?" *Curr Opin HIV AIDS* **10**(1): 18-28.
- Anderson, J. A., L. H. Ping, O. Dibben, C. B. Jabara, L. Arney, L. Kincer, Y. Tang, M. Hobbs, I. Hoffman, P. Kazembe, C. D. Jones, P. Borrow, S. Fiscus, M. S. Cohen, R. Swanstrom and H. I. V. A. V. I. Center for (2010). "HIV-1 Populations in Semen Arise through Multiple Mechanisms." *PLoS Pathog* **6**(8): e1001053.

Andersson, J., A. Boasso, J. Nilsson, R. Zhang, N. J. Shire, S. Lindback, G. M. Shearer and C. A. Chougnnet (2005). "The prevalence of regulatory T cells in lymphoid tissue is correlated with viral load in HIV-infected patients." *J Immunol* **174**(6): 3143-3147.

Angelis, D. S., A. F. Tateno, R. S. Diaz, R. C. Succi, C. S. Pannuti, F. Gouvea Ade and D. M. Machado (2011). "HIV-1 drug resistance genotypic profiles in children with undetectable plasma viremia during antiretroviral therapy." *Braz J Infect Dis* **15**(1): 60-65.

Angelosanto, J. M., S. D. Blackburn, A. Crawford and E. J. Wherry (2012). "Progressive loss of memory T cell potential and commitment to exhaustion during chronic viral infection." *J Virol* **86**(15): 8161-8170.

Anthony, K. B., C. Yoder, J. A. Metcalf, R. DerSimonian, J. M. Orenstein, R. A. Stevens, J. Falloon, M. A. Polis, H. C. Lane and I. Sereti (2003). "Incomplete CD4 T cell recovery in HIV-1 infection after 12 months of highly active antiretroviral therapy is associated with ongoing increased CD4 T cell activation and turnover." *J Acquir Immune Defic Syndr* **33**(2): 125-133.

Appay, V. and D. Sauce (2008). "Immune activation and inflammation in HIV-1 infection: causes and consequences." *J Pathol* **214**(2): 231-241.

Appay, V., R. A. van Lier, F. Sallusto and M. Roederer (2008). "Phenotype and function of human T lymphocyte subsets: consensus and issues." *Cytometry A* **73**(11): 975-983.

Aquaro, S., R. Calio, J. Balzarini, M. C. Bellocchi, E. Garaci and C. F. Perno (2002). "Macrophages and HIV infection: therapeutical approaches toward this strategic virus reservoir." *Antiviral Res* **55**(2): 209-225.

Aravind, L. and E. V. Koonin (1998). "The HD domain defines a new superfamily of metal-dependent phosphohydrolases." *Trends Biochem Sci* **23**(12): 469-472.

Archin, N. M., N. K. Vaidya, J. D. Kuruc, A. L. Liberty, A. Wiegand, M. F. Kearney, M. S. Cohen, J. M. Coffin, R. J. Bosch, C. L. Gay, J. J. Eron, D. M. Margolis and A. S. Perelson (2012). "Immediate antiviral therapy appears to restrict resting CD4+ cell HIV-1 infection without accelerating the decay of latent infection." *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**(24): 9523-9528.

Arnold, L. H., H. C. Groom, S. Kunzelmann, D. Schwefel, S. J. Caswell, P. Ordonez, M. C. Mann, S. Rueschenbaum, D. C. Goldstone, S. Pennell, S. A. Howell, J. P. Stoye, M. Webb, I. A. Taylor and K. N. Bishop (2015). "Phospho-dependent Regulation of SAMHD1 Oligomerisation Couples Catalysis and Restriction." *PLoS Pathog* **11**(10): e1005194.

Aujla, S. J., P. J. Dubin and J. K. Kolls (2007). "Th17 cells and mucosal host defense." *Semin Immunol* **19**(6): 377-382.

Avettand-Fenoel, V., F. Boufassa, J. Galimand, L. Meyer, C. Rouzioux and A. S. C. S. Group (2008). "HIV-1 DNA for the measurement of the HIV reservoir is predictive of disease progression in seroconverters whatever the mode of result expression is." *J Clin Virol* **42**(4): 399-404.

Ayinde, D., C. Maudet, C. Transy and F. Margottin-Goguet (2010). "Limelight on two HIV/SIV accessory proteins in macrophage infection: is Vpx overshadowing Vpr?" *Retrovirology* **7**: 35.

Badia, R., M. Pujantell, E. Riveira-Munoz, T. Puig, J. Torres-Torronteras, R. Marti, B. Clotet, R. M. Ampudia, M. Vives-Pi, J. A. Este and E. Ballana (2016). "The G1/S Specific Cyclin D2 Is a Regulator of HIV-1 Restriction in Non-proliferating Cells." *PLoS Pathog* **12**(8): e1005829.

Badley, A. D., D. Dockrell, M. Simpson, R. Schut, D. H. Lynch, P. Leibson and C. V. Paya (1997). "Macrophage-dependent apoptosis of CD4+ T lymphocytes from HIV-infected individuals is mediated by FasL and tumor necrosis factor." *J Exp Med* **185**(1): 55-64.

Bailey, J. R., A. R. Sedaghat, T. Kieffer, T. Brennan, P. K. Lee, M. Wind-Rotolo, C. M. Haggerty, A. R. Kamireddi, Y. Liu, J. Lee, D. Persaud, J. E. Gallant, J. Cofrancesco, Jr., T. C. Quinn, C. O. Wilke, S. C. Ray, J. D. Siliciano, R. E. Nettles and R. F. Siliciano (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.

Baldanti, F., S. Paolucci, R. Gulminetti, R. Maserati, G. Migliorino, A. Pan, F. Maggiolo, G. Comolli, A. Chiesa and G. Gerna (2001). "Higher levels of HIV DNA in memory and naive CD4(+) T cell subsets of viremic compared to non-viremic patients after 18 and 24 months of HAART." *Antiviral Res* **50**(3): 197-206.

Baldauf, H. M., X. Pan, E. Erikson, S. Schmidt, W. Daddacha, M. Burggraf, K. Schenkova, I. Ambiel, G. Wabnitz, T. Gramberg, S. Panitz, E. Flory, N. R. Landau, S. Sertel, F. Rutsch, F. Lasitschka, B. Kim, R. Konig, O. T. Fackler and O. T. Keppler (2012). "SAMHD1 restricts HIV-1 infection in resting CD4(+) T cells." *Nat Med* **18**(11): 1682-1687.

Ballana, E. and J. A. Este (2015). "SAMHD1: at the crossroads of cell proliferation, immune responses, and virus restriction." *Trends Microbiol* **23**(11): 680-692.

Bandera, A., G. Ferrario, M. Saresella, I. Marventano, A. Soria, F. Zanini, F. Sabbatini, M. Airolidi, G. Marchetti, F. Franzetti, D. Trabattoni, M. Clerici and A. Gori (2010). "CD4+ T cell depletion, immune activation and increased production of regulatory T cells in the thymus of HIV-infected individuals." *PLoS One* **5**(5): e10788.

Banga, R., F. A. Procopio, A. Noto, G. Pollakis, M. Cavassini, K. Ohmiti, J. M. Corpataux, L. de Leval, G. Pantaleo and M. Perreau (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.

Barre-Sinoussi, F., J. C. Chermann, F. Rey, M. T. Nugeyre, S. Chamaret, J. Gruest, C. Dauguet, C. Axler-Blin, F. Vezinet-Brun, C. Rouzioux, W. Rozenbaum and L. Montagnier (1983). "Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS)." *Science* **220**(4599): 868-871.

Barre-Sinoussi, F., A. L. Ross and J. F. Delfraissy (2013). "Past, present and future: 30 years of HIV research." *Nat Rev Microbiol* **11**(12): 877-883.

Becattini, S., D. Latorre, F. Mele, M. Foglierini, C. De Gregorio, A. Cassotta, B. Fernandez, S. Kelderman, T. N. Schumacher, D. Corti, A. Lanzavecchia and F. Sallusto (2015). "T cell immunity. Functional heterogeneity of human memory CD4(+) T cell clones primed by pathogens or vaccines." *Science* **347**(6220): 400-406.

Beliakova-Bethell, N., M. Hezareh, J. K. Wong, M. C. Strain, M. K. Lewinski, D. D. Richman and C. A. Spina (2017). "Relative efficacy of T cell stimuli as inducers of productive HIV-1 replication in latently infected CD4 lymphocytes from patients on suppressive cART." *Virology* **508**: 127-133.

Bell, E. B., S. M. Sparshott, M. T. Drayson and W. L. Ford (1987). "The stable and permanent expansion of functional T lymphocytes in athymic nude rats after a single injection of mature T cells." *J Immunol* **139**(5): 1379-1384.

Beloglazova, N., R. Flick, A. Tchigvintsev, G. Brown, A. Popovic, B. Nocek and A. F. Yakunin (2013). "Nuclease activity of the human SAMHD1 protein implicated in the Aicardi-Goutieres syndrome and HIV-1 restriction." *J Biol Chem* **288**(12): 8101-8110.

Benaroch, P., E. Billard, R. Gaudin, M. Schindler and M. Jouve (2010). "HIV-1 assembly in macrophages." *Retrovirology* **7**: 29.

Bergamaschi, A., A. David, E. Le Rouzic, S. Nisole, F. Barre-Sinoussi and G. Pancino (2009). "The CDK inhibitor p21Cip1/WAF1 is induced by FcγR activation and

restricts the replication of human immunodeficiency virus type 1 and related primate lentiviruses in human macrophages." *J Virol* **83**(23): 12253-12265.

Berger, A., A. F. Sommer, J. Zwarg, M. Hamdorf, K. Welzel, N. Esly, S. Panitz, A. Reuter, I. Ramos, A. Jatiani, L. C. Mulder, A. Fernandez-Sesma, F. Rutsch, V. Simon, R. Konig and E. Flory (2011). "SAMHD1-deficient CD14+ cells from individuals with Aicardi-Goutieres syndrome are highly susceptible to HIV-1 infection." *PLoS Pathog* **7**(12): e1002425.

Berger, G., S. Durand, G. Fargier, X. N. Nguyen, S. Cordeil, S. Bouaziz, D. Muriaux, J. L. Darlix and A. Cimorelli (2011). "APOBEC3A is a specific inhibitor of the early phases of HIV-1 infection in myeloid cells." *PLoS Pathog* **7**(9): e1002221.

Berger, G., C. Goujon, J. L. Darlix and A. Cimorelli (2009). "SIVMAC Vpx improves the transduction of dendritic cells with nonintegrative HIV-1-derived vectors." *Gene Ther* **16**(1): 159-163.

Bernier, A., A. Cleret-Buhot, Y. Zhang, J. P. Goulet, P. Monteiro, A. Gosselin, S. DaFonseca, V. S. Wacleche, M. A. Jenabian, J. P. Routy, C. Tremblay and P. Ancuta (2013). "Transcriptional profiling reveals molecular signatures associated with HIV permissiveness in Th1Th17 cells and identifies peroxisome proliferator-activated receptor gamma as an intrinsic negative regulator of viral replication." *Retrovirology* **10**: 160.

Biancotto, A., S. J. Iglehart, C. Vanpouille, C. E. Condack, A. Lisco, E. Ruecker, I. Hirsch, L. B. Margolis and J. C. Grivel (2008). "HIV-1 induced activation of CD4+ T cells creates new targets for HIV-1 infection in human lymphoid tissue ex vivo." *Blood* **111**(2): 699-704.

Bibollet-Ruche, F., E. Bailes, F. Gao, X. Pourrut, K. L. Barlow, J. P. Clewley, J. M. Mwenda, D. K. Langat, G. K. Chege, H. M. McClure, E. Mpoudi-Ngole, E. Delaporte, M. Peeters, G. M. Shaw, P. M. Sharp and B. H. Hahn (2004). "New simian immunodeficiency virus infecting De Brazza's monkeys (*Cercopithecus neglectus*): evidence for a cercopithecus monkey virus clade." *J Virol* **78**(14): 7748-7762.

Bixler, S. L. and J. J. Mattapallil (2013). "Loss and dysregulation of Th17 cells during HIV infection." *Clin Dev Immunol* **2013**: 852418.

Bixler, S. L., N. G. Sandler, D. C. Douek and J. J. Mattapallil (2013). "Suppressed Th17 levels correlate with elevated PIAS3, SHP2, and SOCS3 expression in CD4 T cells during acute simian immunodeficiency virus infection." *J Virol* **87**(12): 7093-7101.

Blackard, J. T., G. Ma, C. M. Martin, S. D. Rouster, M. T. Shata and K. E. Sherman (2011). "HIV variability in the liver and evidence of possible compartmentalization." *AIDS Res Hum Retroviruses* **27**(10): 1117-1126.

Blankson, J. N., D. Persaud and R. F. Siliciano (2002). "The challenge of viral reservoirs in HIV-1 infection." *Annu Rev Med* **53**: 557-593.

Boltz, V. F., J. Rausch, W. Shao, J. Hattori, B. Luke, F. Maldarelli, J. W. Mellors, M. F. Kearney and J. M. Coffin (2016). "Ultrasensitive single-genome sequencing: accurate, targeted, next generation sequencing of HIV-1 RNA." *Retrovirology* **13**(1): 87.

Boritz, E. A., S. Darko, L. Swaszek, G. Wolf, D. Wells, X. Wu, A. R. Henry, F. Laboune, J. Hu, D. Ambrozak, M. S. Hughes, R. Hoh, J. P. Casazza, A. Vostal, D. Bunis, K. Nganou-Makamdop, J. S. Lee, S. A. Migueles, R. A. Koup, M. Connors, S. Moir, T. Schacker, F. Maldarelli, S. H. Hughes, S. G. Deeks and D. C. Douek (2016). "Multiple Origins of Virus Persistence during Natural Control of HIV Infection." *Cell* **166**(4): 1004-1015.

Borrow, P., H. Lewicki, B. H. Hahn, G. M. Shaw and M. B. Oldstone (1994). "Virus-specific CD8+ cytotoxic T-lymphocyte activity associated with control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 infection." *J Virol* **68**(9): 6103-6110.

Bosque, A., M. Famiglietti, A. S. Weyrich, C. Goulston and V. Planelles (2011). "Homeostatic proliferation fails to efficiently reactivate HIV-1 latently infected central memory CD4+ T cells." *PLoS Pathog* **7**(10): e1002288.

Bosque, A. and V. Planelles (2009). "Induction of HIV-1 latency and reactivation in primary memory CD4+ T cells." *Blood* **113**(1): 58-65.

Brady, T., L. M. Agosto, N. Malani, C. C. Berry, U. O'Doherty and F. Bushman (2009). "HIV integration site distributions in resting and activated CD4+ T cells infected in culture." *AIDS* **23**(12): 1461-1471.

Brenchley, J. M., B. J. Hill, D. R. Ambrozak, D. A. Price, F. J. Guenaga, J. P. Casazza, J. Kuruppu, J. Yazdani, S. A. Migueles, M. Connors, M. Roederer, D. C. Douek and R. A. Koup (2004). "T-cell subsets that harbor human immunodeficiency virus (HIV) in vivo: implications for HIV pathogenesis." *J Virol* **78**(3): 1160-1168.

Brenchley, J. M., M. Paiardini, K. S. Knox, A. I. Asher, B. Cervasi, T. E. Asher, P. Scheinberg, D. A. Price, C. A. Hage, L. M. Kholi, A. Khoruts, I. Frank, J. Else, T. Schacker, G. Silvestri and D. C. Douek (2008). "Differential Th17 CD4 T-cell depletion in pathogenic and nonpathogenic lentiviral infections." *Blood* **112**(7): 2826-2835.

Brenchley, J. M., D. A. Price, T. W. Schacker, T. E. Asher, G. Silvestri, S. Rao, Z. Kazzaz, E. Bornstein, O. Lambotte, D. Altmann, B. R. Blazar, B. Rodriguez, L. Teixeira-Johnson, A. Landay, J. N. Martin, F. M. Hecht, L. J. Picker, M. M. Lederman, S. G. Deeks and D. C. Douek (2006). "Microbial translocation is a cause of systemic immune activation in chronic HIV infection." *Nat Med* **12**(12): 1365-1371.

Brenchley, J. M., T. W. Schacker, L. E. Ruff, D. A. Price, J. H. Taylor, G. J. Beilman, P. L. Nguyen, A. Khoruts, M. Larson, A. T. Haase and D. C. Douek (2004). "CD4+ T cell depletion during all stages of HIV disease occurs predominantly in the gastrointestinal tract." *J Exp Med* **200**(6): 749-759.

Brooks, D. G., S. G. Kitchen, C. M. Kitchen, D. D. Scripture-Adams and J. A. Zack (2001). "Generation of HIV latency during thymopoiesis." *Nat Med* **7**(4): 459-464.

Brown, D. and J. J. Mattapallil (2014). "Gastrointestinal tract and the mucosal macrophage reservoir in HIV infection." *Clin Vaccine Immunol* **21**(11): 1469-1473.

Bruner, K. M., A. J. Murray, R. A. Pollack, M. G. Soliman, S. B. Laskey, A. A. Capoferri, J. Lai, M. C. Strain, S. M. Lada, R. Hoh, Y. C. Ho, D. D. Richman, S. G. Deeks, J. D. Siliciano and R. F. Siliciano (2016). "Defective proviruses rapidly accumulate during acute HIV-1 infection." *Nat Med* **22**(9): 1043-1049.

Bullen, C. K., G. M. Laird, C. M. Durand, J. D. Siliciano and R. F. Siliciano (2014). "New ex vivo approaches distinguish effective and ineffective single agents for reversing HIV-1 latency in vivo." *Nat Med* **20**(4): 425-429.

Burton, G. F., B. F. Keele, J. D. Estes, T. C. Thacker and S. Gartner (2002). "Follicular dendritic cell contributions to HIV pathogenesis." *Semin Immunol* **14**(4): 275-284.

Butler, D. M., W. Delpont, S. L. Kosakovsky Pond, M. K. Lakdawala, P. M. Cheng, S. J. Little, D. D. Richman and D. M. Smith (2010). "The origins of sexually transmitted HIV among men who have sex with men." *Sci Transl Med* **2**(18): 18re11.

Buzon, M. J., F. M. Codoner, S. D. Frost, C. Pou, M. C. Puertas, M. Massanella, J. Dalmau, J. M. Llibre, M. Stevenson, J. Blanco, B. Clotet, R. Paredes and J. Martinez-Picado (2011). "Deep molecular characterization of HIV-1 dynamics under suppressive HAART." *PLoS Pathog* **7**(10): e1002314.

Buzon, M. J., E. Martin-Gayo, F. Pereyra, Z. Ouyang, H. Sun, J. Z. Li, M. Piovoso, A. Shaw, J. Dalmau, N. Zangger, J. Martinez-Picado, R. Zurakowski, X. G. Yu, A. Telenti, B. D. Walker, E. S. Rosenberg and M. Lichterfeld (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.

Buzon, M. J., H. Sun, C. Li, A. Shaw, K. Seiss, Z. Ouyang, E. Martin-Gayo, J. Leng, T. J. Henrich, J. Z. Li, F. Pereyra, R. Zurakowski, B. D. Walker, E. S. Rosenberg, X. G. Yu and M. Lichterfeld (2014). "HIV-1 persistence in CD4+ T cells with stem cell-like properties." *Nat Med* **20**(2): 139-142.

Byrn, R. A. and A. A. Kiessling (1998). "Analysis of human immunodeficiency virus in semen: indications of a genetically distinct virus reservoir." *J Reprod Immunol* **41**(1-2): 161-176.

Cameron, P. U., S. Saleh, G. Sallmann, A. Solomon, F. Wightman, V. A. Evans, G. Boucher, E. K. Haddad, R. P. Sekaly, A. N. Harman, J. L. Anderson, K. L. Jones, J. Mak, A. L. Cunningham, A. Jaworowski and S. R. Lewin (2010). "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* **107**(39): 16934-16939.

Campbell, J. J. and E. C. Butcher (2000). "Chemokines in tissue-specific and microenvironment-specific lymphocyte homing." *Curr Opin Immunol* **12**(3): 336-341.

Campbell-Yesufu, O. T. and R. T. Gandhi (2011). "Update on human immunodeficiency virus (HIV)-2 infection." *Clin Infect Dis* **52**(6): 780-787.

Campisi, J. and F. d'Adda di Fagagna (2007). "Cellular senescence: when bad things happen to good cells." *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**(9): 729-740.

Cao, Y., L. Qin, L. Zhang, J. Safrin and D. D. Ho (1995). "Virologic and immunologic characterization of long-term survivors of human immunodeficiency virus type 1 infection." *N Engl J Med* **332**(4): 201-208.

Carter, C. A. and L. S. Ehrlich (2008). "Cell biology of HIV-1 infection of macrophages." *Annu Rev Microbiol* **62**: 425-443.

Carter, C. C., G. A. Wagner, G. K. Hightower, G. Caballero, P. Phung, D. D. Richman, S. L. Pond and D. M. Smith (2015). "HIV-1 neutralizing antibody response and viral genetic diversity characterized with next generation sequencing." *Virology* **474**: 34-40.

Casartelli, N., M. Sourisseau, J. Feldmann, F. Guivel-Benhassine, A. Mallet, A. G. Marcelin, J. Guatelli and O. Schwartz (2010). "Tetherin restricts productive HIV-1 cell-to-cell transmission." *PLoS Pathog* **6**(6): e1000955.

Cavarelli, M. and G. Scarlatti (2014). "HIV-1 infection: the role of the gastrointestinal tract." *Am J Reprod Immunol* **71**(6): 537-542.

Chahroudi, A., S. E. Bosinger, T. H. Vanderford, M. Paiardini and G. Silvestri (2012). "Natural SIV hosts: showing AIDS the door." *Science* **335**(6073): 1188-1193.

Chaillon, A., S. Gianella, S. M. Lada, J. Perez-Santiago, P. Jordan, C. Ignacio, M. Karris, D. D. Richman, S. R. Mehta, S. J. Little, J. O. Wertheim and D. M. Smith (2018). "Size, Composition, and Evolution of HIV DNA Populations during Early Antiretroviral Therapy and Intensification with Maraviroc." *J Virol* **92**(3).

Chaillon, A., S. Gianella, J. O. Wertheim, D. D. Richman, S. R. Mehta and D. M. Smith (2014). "HIV migration between blood and cerebrospinal fluid or semen over time." *J Infect Dis* **209**(10): 1642-1652.

Chaillon, A., M. Nakazawa, J. O. Wertheim, S. J. Little, D. M. Smith, S. R. Mehta and S. Gianella (2017). "No Substantial Evidence for Sexual Transmission of Minority HIV Drug Resistance Mutations in Men Who Have Sex with Men." *J Virol* **91**(21).

Chan, D. J. (2005). "Pathophysiology of HIV-1 in semen: current evidence for compartmentalisation and penetration by antiretroviral drugs." *Curr HIV Res* **3**(3): 207-222.

Chase, A. J., A. R. Sedaghat, J. R. German, L. Gama, M. C. Zink, J. E. Clements and R. F. Siliciano (2007). "Severe depletion of CD4+ CD25+ regulatory T cells from the intestinal lamina propria but not peripheral blood or lymph nodes during acute simian immunodeficiency virus infection." *J Virol* **81**(23): 12748-12757.

Chevalier, M. F. and L. Weiss (2013). "The split personality of regulatory T cells in HIV infection." *Blood* **121**(1): 29-37.

Cheynier, R., S. Henrichwark, F. Hadida, E. Pelletier, E. Oksenhendler, B. Autran and S. Wain-Hobson (1994). "HIV and T cell expansion in splenic white pulps is accompanied by infiltration of HIV-specific cytotoxic T lymphocytes." *Cell* **78**(3): 373-387.

Ching, N., K. A. Nielsen-Saines, J. G. Deville, L. S. Wei, E. Garratty and Y. J. Bryson (2010). "Autologous neutralizing antibody to human immunodeficiency virus-1 and replication-competent virus recovered from CD4+ T-cell reservoirs in pediatric HIV-1-infected patients on HAART." *AIDS Res Hum Retroviruses* **26**(5): 585-591.

Choi, J. Y., A. Chaillon, J. O. Oh, J. Y. Ahn, H. W. Ann, I. Y. Jung, M. Y. Ahn, Y. D. Jeon, N. S. Ku, D. M. Smith and J. M. Kim (2016). "HIV migration between blood plasma and cellular subsets before and after HIV therapy." *J Med Virol* **88**(4): 606-613.

Chomont, N., M. El-Far, P. Ancuta, L. Trautmann, F. A. Procopio, B. Yassine-Diab, G. Boucher, M. R. Boulassel, G. Ghattas, J. M. Brenchley, T. W. Schacker, B. J. Hill, D. C. Douek, J. P. Routy, E. K. Haddad and R. P. Sekaly (2009). "HIV reservoir size and persistence are driven by T cell survival and homeostatic proliferation." *Nat Med* **15**(8): 893-900.

Chomont, N., H. Hocini, G. Gresenguet, C. Brochier, H. Bouhlal, L. Andreoletti, P. Becquart, C. Charpentier, J. de Dieu Longo, A. Si-Mohamed, M. D. Kazatchkine and L. Belec (2007). "Early archives of genetically-restricted proviral DNA in the female genital tract after heterosexual transmission of HIV-1." *AIDS* **21**(2): 153-162.

Choudhury, B., D. Pillay, S. Taylor and P. A. Cane (2002). "Analysis of HIV-1 variation in blood and semen during treatment and treatment interruption." *J Med Virol* **68**(4): 467-472.

Chun, T. W., L. Carruth, D. Finzi, X. Shen, J. A. DiGiuseppe, H. Taylor, M. Hermankova, K. Chadwick, J. Margolick, T. C. Quinn, Y. H. Kuo, R. Brookmeyer, M. A. Zeiger, P. Barditch-Crovo and R. F. Siliciano (1997). "Quantification of latent tissue reservoirs and total body viral load in HIV-1 infection." *Nature* **387**(6629): 183-188.

Chun, T. W., R. T. Davey, Jr., M. Ostrowski, J. Shawn Justement, D. Engel, J. I. Mullins and A. S. Fauci (2000). "Relationship between pre-existing viral reservoirs and the re-emergence of plasma viremia after discontinuation of highly active anti-retroviral therapy." *Nat Med* **6**(7): 757-761.

Chun, T. W., D. Engel, M. M. Berrey, T. Shea, L. Corey and A. S. Fauci (1998). "Early establishment of a pool of latently infected, resting CD4(+) T cells during primary HIV-1 infection." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(15): 8869-8873.

Chun, T. W., D. Finzi, J. Margolick, K. Chadwick, D. Schwartz and R. F. Siliciano (1995). "In vivo fate of HIV-1-infected T cells: quantitative analysis of the transition to stable latency." *Nat Med* **1**(12): 1284-1290.

Chun, T. W., J. S. Justement, S. Moir, C. W. Hallahan, J. Maenza, J. I. Mullins, A. C. Collier, L. Corey and A. S. Fauci (2007). "Decay of the HIV reservoir in patients receiving antiretroviral therapy for extended periods: implications for eradication of virus." *J Infect Dis* **195**(12): 1762-1764.

Chun, T. W., D. C. Nickle, J. S. Justement, D. Large, A. Semerjian, M. E. Curlin, M. A. O'Shea, C. W. Hallahan, M. Daucher, D. J. Ward, S. Moir, J. I. Mullins, C. Kovacs and A. S. Fauci (2005). "HIV-infected individuals receiving effective antiviral therapy for extended

periods of time continually replenish their viral reservoir." *J Clin Invest* **115**(11): 3250-3255.

Chun, T. W., D. C. Nickle, J. S. Justement, J. H. Meyers, G. Roby, C. W. Hallahan, S. Kottlil, S. Moir, J. M. Mican, J. I. Mullins, D. J. Ward, J. A. Kovacs, P. J. Mannon and A. S. Fauci (2008). "Persistence of HIV in gut-associated lymphoid tissue despite long-term antiretroviral therapy." *J Infect Dis* **197**(5): 714-720.

Chun, T. W., L. Stuyver, S. B. Mizell, L. A. Ehler, J. A. Mican, M. Baseler, A. L. Lloyd, M. A. Nowak and A. S. Fauci (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.

Chung, D. R., D. L. Kasper, R. J. Panzo, T. Chitnis, M. J. Grusby, M. H. Sayegh and A. O. Tzianabos (2003). "CD4+ T cells mediate abscess formation in intra-abdominal sepsis by an IL-17-dependent mechanism." *J Immunol* **170**(4): 1958-1963.

Cieri, N., B. Camisa, F. Cocchiarella, M. Forcato, G. Oliveira, E. Provasi, A. Bondanza, C. Bordignon, J. Peccatori, F. Ciceri, M. T. Lupo-Stanghellini, F. Mavilio, A. Mondino, S. Bicciato, A. Recchia and C. Bonini (2013). "IL-7 and IL-15 instruct the generation of human memory stem T cells from naive precursors." *Blood* **121**(4): 573-584.

Cillo, A. R., M. D. Sobolewski, R. J. Bosch, E. Fyne, M. Piatak, Jr., J. M. Coffin and J. W. Mellors (2014). "Quantification of HIV-1 latency reversal in resting CD4+ T cells from patients on suppressive antiretroviral therapy." *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**(19): 7078-7083.

Cimarelli, A., C. A. Duclos, A. Gessain, E. Cattaneo, C. Casoli, M. Biglione, P. Mauciere and U. Bertazzoni (1995). "Quantification of HTLV-II proviral copies by competitive polymerase chain reaction in peripheral blood mononuclear cells of Italian injecting drug users, central Africans, and Amerindians." *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* **10**(2): 198-204.

Clavel, F., M. Guyader, D. Guetard, M. Salle, L. Montagnier and M. Alizon (1986). "Molecular cloning and polymorphism of the human immune deficiency virus type 2." *Nature* **324**(6098): 691-695.

Cochrane, A., G. J. Hughes, R. A. Seaton and P. Simmonds (2005). "First evidence of HIV infection of CD8 lymphocytes expressing CD4 during primary HIV-1 infection." *AIDS* **19**(11): 1237-1239.

Cockerham, L. R., J. D. Siliciano, E. Sinclair, U. O'Doherty, S. Palmer, S. A. Yukl, M. C. Strain, N. Chomont, F. M. Hecht, R. F. Siliciano, D. D. Richman and S. G. Deeks (2014). "CD4+ and CD8+ T cell activation are associated with HIV DNA in resting CD4+ T cells." *PLoS One* **9**(10): e110731.

Coffin, J., A. Haase, J. A. Levy, L. Montagnier, S. Oroszlan, N. Teich, H. Temin, K. Toyoshima, H. Varmus, P. Vogt and et al. (1986). "What to call the AIDS virus?" *Nature* **321**(6065): 10.

Coffin, J. and R. Swanstrom (2013). "HIV pathogenesis: dynamics and genetics of viral populations and infected cells." *Cold Spring Harb Perspect Med* **3**(1): a012526.

Cohen, M. S., Y. Q. Chen, M. McCauley, T. Gamble, M. C. Hosseinipour, N. Kumarasamy, J. G. Hakim, J. Kumwenda, B. Grinsztejn, J. H. Pilotto, S. V. Godbole, S. Mehendale, S. Chariyalertsak, B. R. Santos, K. H. Mayer, I. F. Hoffman, S. H. Eshleman, E. Piwowar-Manning, L. Wang, J. Makhema, L. A. Mills, G. de Bruyn, I. Sanne, J. Eron, J. Gallant, D. Havlir, S. Swindells, H. Ribaud, V. Elharrar, D. Burns, T. E. Taha, K. Nielsen-Saines, D. Celentano, M. Essex, T. R. Fleming and H. S. Team (2011). "Prevention of HIV-1 infection with early antiretroviral therapy." *N Engl J Med* **365**(6): 493-505.

Cohen, M. S., G. M. Shaw, A. J. McMichael and B. F. Haynes (2011). "Acute HIV-1 Infection." *N Engl J Med* **364**(20): 1943-1954.

Cohn, L. B., I. T. da Silva, R. Valieris, A. S. Huang, J. C. C. Lorenzi, Y. Z. Cohen, J. A. Pai, A. L. Butler, M. Caskey, M. Jankovic and M. C. Nussenzweig (2018). "Clonal CD4(+) T cells in the HIV-1 latent reservoir display a distinct gene profile upon reactivation." *Nat Med* **24**(5): 604-609.

Cohn, L. B., I. T. Silva, T. Y. Oliveira, R. A. Rosales, E. H. Parrish, G. H. Learn, B. H. Hahn, J. L. Czartoski, M. J. McElrath, C. Lehmann, F. Klein, M. Caskey, B. D. Walker, J. D. Siliciano, R. F. Siliciano, M. Jankovic and M. C. Nussenzweig (2015). "HIV-1 integration landscape during latent and active infection." *Cell* **160**(3): 420-432.

Coiras, M., M. Bermejo, B. Descours, E. Mateos, J. Garcia-Perez, M. R. Lopez-Huertas, M. M. Lederman, M. Benkirane and J. Alami (2016). "IL-7 Induces SAMHD1 Phosphorylation in CD4+ T Lymphocytes, Improving Early Steps of HIV-1 Life Cycle." *Cell Rep* **14**(9): 2100-2107.

Coleman, C. M. and L. Wu (2009). "HIV interactions with monocytes and dendritic cells: viral latency and reservoirs." *Retrovirology* **6**: 51.

Cooper, A., M. Garcia, C. Petrovas, T. Yamamoto, R. A. Koup and G. J. Nabel (2013). "HIV-1 causes CD4 cell death through DNA-dependent protein kinase during viral integration." *Nature* **498**(7454): 376-379.

Cosmi, L., L. Maggi, V. Santarasci, F. Liotta and F. Annunziato (2014). "T helper cells plasticity in inflammation." *Cytometry A* **85**(1): 36-42.

Costiniuk, C. T., C. Kovacs, J. P. Routy, J. Singer, S. Gurunathan, R. P. Sekaly and J. B. Angel (2013). "Short communication: human immunodeficiency virus rebound in blood and seminal plasma following discontinuation of antiretroviral therapy." *AIDS Res Hum Retroviruses* **29**(2): 266-269.

Craigie, R. (2001). "HIV integrase, a brief overview from chemistry to therapeutics." *J Biol Chem* **276**(26): 23213-23216.

Craigie, R. and F. D. Bushman (2012). "HIV DNA integration." *Cold Spring Harb Perspect Med* **2**(7): a006890.

Cribier, A., B. Descours, A. L. Valadao, N. Laguette and M. Benkirane (2013). "Phosphorylation of SAMHD1 by cyclin A2/CDK1 regulates its restriction activity toward HIV-1." *Cell Rep* **3**(4): 1036-1043.

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

Crotty, S. (2011). "Follicular helper CD4 T cells (TFH)." *Annu Rev Immunol* **29**: 621-663.

Crow, Y. J. (2013). "Aicardi-Goutieres syndrome." *Handb Clin Neurol* **113**: 1629-1635.

Crow, Y. J., D. S. Chase, J. Lowenstein Schmidt, M. Szykiewicz, G. M. Forte, H. L. Gornall, A. Oojageer, B. Anderson, A. Pizzino, G. Helman, M. S. Abdel-Hamid, G. M. Abdel-Salam, S. Ackroyd, A. Aeby, G. Agosta, C. Albin, S. Allon-Shalev, M. Arellano, G. Ariaudo, V. Aswani, R. Babul-Hirji, E. M. Baidam, N. Bahi-Buisson, K. M. Bailey, C. Barnerias, M. Barth, R. Battini, M. W. Beresford, G. Bernard, M. Bianchi, T. Billette de Villemeur, E. M. Blair, M. Bloom, A. B. Burlina, M. L. Carpanelli, D. R. Carvalho, M. Castro-Gago, A. Cavallini, C. Cereda, K. E. Chandler, D. A. Chitayat, A. E. Collins, C. Sierra Corcoles, N. J. Cordeiro, G. Crichiutti, L. Dabydeen, R. C. Dale, S. D'Arrigo, C. G. De Goede, C. De Laet, L. M. De Waele, I. Denzler, I. Desguerre, K. Devriendt, M. Di Rocco, M. C. Fahey, E. Fazzi, C. D. Ferrie, A. Figueiredo, B. Gener, C. Goizet, N. R. Gowrinathan, K. Gowrishankar, D. Hanrahan, B. Isidor, B. Kara, N. Khan, M. D. King, E. P. Kirk, R. Kumar, L. Lagae, P. Landrieu, H. Lauffer, V. Laugel, R. La Piana, M. J. Lim, J. P. Lin, T. Linnankivi, M. T. Mackay, D. R. Marom, C. Marques Lourenco, S. A. McKee, I. Moroni, J. E. Morton, M. L. Moutard, K. Murray, R.

Nabbout, S. Nampoothiri, N. Nunez-Enamorado, P. J. Oades, I. Olivieri, J. R. Ostergaard, B. Perez-Duenas, J. S. Prendiville, V. Ramesh, M. Rasmussen, L. Regal, F. Ricci, M. Rio, D. Rodriguez, A. Roubertie, E. Salvatici, K. A. Segers, G. P. Sinha, D. Soler, R. Spiegel, T. I. Stodberg, R. Straussberg, K. J. Swoboda, M. Suri, U. Tacke, T. Y. Tan, J. te Water Naude, K. Wee Teik, M. M. Thomas, M. Till, D. Tonduti, E. M. Valente, R. N. Van Coster, M. S. van der Knaap, G. Vassallo, R. Vijzelaar, J. Vogt, G. B. Wallace, E. Wassmer, H. J. Webb, W. P. Whitehouse, R. N. Whitney, M. S. Zaki, S. M. Zuberi, J. H. Livingston, F. Rozenberg, P. Lebon, A. Vanderver, S. Orcesi and G. I. Rice (2015). "Characterization of human disease phenotypes associated with mutations in TREX1, RNASEH2A, RNASEH2B, RNASEH2C, SAMHD1, ADAR, and IFIH1." *Am J Med Genet A* **167A**(2): 296-312.

Crowe, S., T. Zhu and W. A. Muller (2003). "The contribution of monocyte infection and trafficking to viral persistence, and maintenance of the viral reservoir in HIV infection." *J Leukoc Biol* **74**(5): 635-641.

Crowe, S. M., J. Mills, J. Kirihara, J. Boothman, J. A. Marshall and M. S. McGrath (1990). "Full-length recombinant CD4 and recombinant gp120 inhibit fusion between HIV infected macrophages and uninfected CD4-expressing T-lymphoblastoid cells." *AIDS Res Hum Retroviruses* **6**(8): 1031-1037.

D'Arc, M., A. Ayouba, A. Esteban, G. H. Learn, V. Boue, F. Liegeois, L. Etienne, N. Tagg, F. H. Leendertz, C. Boesch, N. F. Madinda, M. M. Robbins, M. Gray, A. Cournil, M. Ooms, M. Letko, V. A. Simon, P. M. Sharp, B. H. Hahn, E. Delaporte, E. Mpoudi Ngole and M. Peeters (2015). "Origin of the HIV-1 group O epidemic in western lowland gorillas." *Proc Natl Acad Sci U S A* **112**(11): E1343-1352.

D'Souza, M., A. P. Fontenot, D. G. Mack, C. Lozupone, S. Dillon, A. Meditz, C. C. Wilson, E. Connick and B. E. Palmer (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.

Dale, R. C., H. Gornall, D. Singh-Grewal, M. Alcausin, G. I. Rice and Y. J. Crow (2010). "Familial Aicardi-Goutieres syndrome due to SAMHD1 mutations is associated with chronic arthropathy and contractures." *Am J Med Genet A* **152A**(4): 938-942.

Dalgleish, A. G., P. C. Beverley, P. R. Clapham, D. H. Crawford, M. F. Greaves and R. A. Weiss (1984). "The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus." *Nature* **312**(5996): 763-767.

Damouche, A., T. Lazure, V. Avettand-Fenoel, N. Huot, N. Dejucq-Rainsford, A. P. Satie, A. Melard, L. David, C. Gomet, J. Ghosn, N. Noel, G. Pourcher, V. Martinez, S. Benoist, V. Bereziat, A. Cosma, B. Favier, B. Vaslin, C. Rouzioux, J. Capeau, M. Muller-Trutwin, N. Dereuddre-Bosquet, R. Le Grand, O. Lambotte and C. Bourgeois (2015). "Adipose Tissue Is a Neglected Viral Reservoir and an Inflammatory Site during Chronic HIV and SIV Infection." *PLoS Pathog* **11**(9): e1005153.

Davey, R. T., Jr., N. Bhat, C. Yoder, T. W. Chun, J. A. Metcalf, R. Dewar, V. Natarajan, R. A. Lempicki, J. W. Adelsberger, K. D. Miller, J. A. Kovacs, M. A. Polis, R. E. Walker, J. Falloon, H. Masur, D. Gee, M. Baseler, D. S. Dimitrov, A. S. Fauci and H. C. Lane (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.

Day, C. L., D. E. Kaufmann, P. Kiepiela, J. A. Brown, E. S. Moodley, S. Reddy, E. W. Mackey, J. D. Miller, A. J. Leslie, C. DePierres, Z. Mncube, J. Duraiswamy, B. Zhu, Q. Eichbaum, M. Altfeld, E. J. Wherry, H. M. Coovadia, P. J. Goulder, P. Klenerman, R. Ahmed, G. J. Freeman and B. D. Walker (2006). "PD-1 expression on HIV-specific T cells is associated with T-cell exhaustion and disease progression." *Nature* **443**(7109): 350-354.

De Pasquale, M. P., A. J. Leigh Brown, S. C. Uvin, J. Allega-Ingersoll, A. M. Caliendo, L. Sutton, S. Donahue and R. T. D'Aquila (2003). "Differences in HIV-1 pol sequences from female genital tract and blood during antiretroviral therapy." *J Acquir Immune Defic Syndr* **34**(1): 37-44.

de Repentigny, L., M. Goupil and P. Jolicoeur (2015). "Oropharyngeal Candidiasis in HIV Infection: Analysis of Impaired Mucosal Immune Response to *Candida albicans* in Mice Expressing the HIV-1 Transgene." *Pathogens* **4**(2): 406-421.

de Silva, S., H. Hoy, T. S. Hake, H. K. Wong, P. Porcu and L. Wu (2013). "Promoter methylation regulates SAMHD1 gene expression in human CD4+ T cells." *J Biol Chem* **288**(13): 9284-9292.

de Silva, S., F. Wang, T. S. Hake, P. Porcu, H. K. Wong and L. Wu (2014). "Downregulation of SAMHD1 expression correlates with promoter DNA methylation in Sezary syndrome patients." *J Invest Dermatol* **134**(2): 562-565.

Deeks, S. G., C. M. Kitchen, L. Liu, H. Guo, R. Gascon, A. B. Narvaez, P. Hunt, J. N. Martin, J. O. Kahn, J. Levy, M. S. McGrath and F. M. Hecht (2004). "Immune activation set point during early HIV infection predicts subsequent CD4+ T-cell changes independent of viral load." *Blood* **104**(4): 942-947.

Deeks, S. G., S. R. Lewin, A. L. Ross, J. Ananworanich, M. Benkirane, P. Cannon, N. Chomont, D. Douek, J. D. Lifson, Y. R. Lo, D. Kuritzkes, D. Margolis, J. Mellors, D. Persaud, J. D. Tucker, F. Barre-Sinoussi, A. S. T. a. C. W. G. International, G. Alter, J. Auerbach, B. Autran, D. H. Barouch, G. Behrens, M. Cavazzana, Z. Chen, E. A. Cohen, G. M. Corbelli, S. Eholie, N. Eyal, S. Fidler, L. Garcia, C. Grossman, G. Henderson, T. J. Henrich, R. Jefferys, H. P. Kiem, J. McCune, K. Moodley, P. A. Newman, M. Nijhuis, M. S. Nsubuga, M. Ott, S. Palmer, D. Richman, A. Saez-Cirion, M. Sharp, J. Siliciano, G. Silvestri, J. Singh, B. Spire, J. Taylor, M. Tolstrup, S. Valente, J. van Lunzen, R. Walensky, I. Wilson and J. Zack (2016). "International AIDS Society global scientific strategy: towards an HIV cure 2016." *Nat Med* **22**(8): 839-850.

Deeks, S. G. and B. D. Walker (2007). "Human immunodeficiency virus controllers: mechanisms of durable virus control in the absence of antiretroviral therapy." *Immunity* **27**(3): 406-416.

Deleage, C., M. Moreau, N. Rioux-Leclercq, A. Ruffault, B. Jegou and N. Dejucq-Rainsford (2011). "Human immunodeficiency virus infects human seminal vesicles in vitro and in vivo." *Am J Pathol* **179**(5): 2397-2408.

Delelis, O., K. Carayon, A. Saib, E. Deprez and J. F. Mouscadet (2008). "Integrase and integration: biochemical activities of HIV-1 integrase." *Retrovirology* **5**: 114.

Delobel, P., K. Sandres-Saune, M. Cazabat, F. E. L'Faqihi, C. Aquilina, M. Obadia, C. Pasquier, B. Marchou, P. Massip and J. Izopet (2005). "Persistence of distinct HIV-1 populations in blood monocytes and naive and memory CD4 T cells during prolonged suppressive HAART." *AIDS* **19**(16): 1739-1750.

Desai, S. and A. Landay (2010). "Early immune senescence in HIV disease." *Curr HIV/AIDS Rep* **7**(1): 4-10.

Descours, B., A. Cribier, C. Chable-Bessia, D. Ayinde, G. Rice, Y. Crow, A. Yatim, O. Schwartz, N. Laguette and M. Benkirane (2012). "SAMHD1 restricts HIV-1 reverse transcription in quiescent CD4(+) T-cells." *Retrovirology* **9**: 87.

Diamond, T. L., M. Roshal, V. K. Jamburuthugoda, H. M. Reynolds, A. R. Merriam, K. Y. Lee, M. Balakrishnan, R. A. Bambara, V. Planelles, S. Dewhurst and B. Kim (2004). "Macrophage tropism of HIV-1 depends on efficient cellular dNTP utilization by reverse transcriptase." *J Biol Chem* **279**(49): 51545-51553.

Doitsh, G. and W. C. Greene (2016). "Dissecting How CD4 T Cells Are Lost During HIV Infection." *Cell Host Microbe* **19**(3): 280-291.

Domingo, E. (1998). "Quasispecies and the implications for virus persistence and escape." *Clin Diagn Virol* **10**(2-3): 97-101.

Douek, D. C., J. M. Brenchley, M. R. Betts, D. R. Ambrozak, B. J. Hill, Y. Okamoto, J. P. Casazza, J. Kuruppu, K. Kunstman, S. Wolinsky, Z. Grossman, M. Dybul, A. Oxenius, D. A. Price, M. Connors and R. A. Koup (2002). "HIV preferentially infects HIV-specific CD4+ T cells." *Nature* **417**(6884): 95-98.

Douek, D. C., L. J. Picker and R. A. Koup (2003). "T cell dynamics in HIV-1 infection." *Annu Rev Immunol* **21**: 265-304.

Douglas, J. L., K. Viswanathan, M. N. McCarroll, J. K. Gustin, K. Fruh and A. V. Moses (2009). "Vpu directs the degradation of the human immunodeficiency virus restriction factor BST-2/Tetherin via a β TrCP-dependent mechanism." *J Virol* **83**(16): 7931-7947.

Doyle, T., C. Goujon and M. H. Malim (2015). "HIV-1 and interferons: who's interfering with whom?" *Nat Rev Microbiol* **13**(7): 403-413.

Dubey, S., Y. D. Satyanarayana and H. Lavania (2007). "Development of integrase inhibitors for treatment of AIDS: an overview." *Eur J Med Chem* **42**(9): 1159-1168.

Duncan, C. J., R. A. Russell and Q. J. Sattentau (2013). "High multiplicity HIV-1 cell-to-cell transmission from macrophages to CD4+ T cells limits antiretroviral efficacy." *AIDS* **27**(14): 2201-2206.

Dybul, M., M. Daucher, M. A. Jensen, C. W. Hallahan, T. W. Chun, M. Belson, B. Hidalgo, D. C. Nickle, C. Yoder, J. A. Metcalf, R. T. Davey, L. Ehler, D. Kress-Rock, E. Nies-Kraske, S. Liu, J. I. Mullins and A. S. Fauci (2003). "Genetic characterization of rebounding human immunodeficiency virus type 1 in plasma during multiple interruptions of highly active antiretroviral therapy." *J Virol* **77**(5): 3229-3237.

Effros, R. B. and G. Pawelec (1997). "Replicative senescence of T cells: does the Hayflick Limit lead to immune exhaustion?" *Immunol Today* **18**(9): 450-454.

El Hed, A., A. Khaitan, L. Kozhaya, N. Manel, D. Daskalakis, W. Borkowsky, F. Valentine, D. R. Littman and D. Unutmaz (2010). "Susceptibility of human Th17 cells to human immunodeficiency virus and their perturbation during infection." *J Infect Dis* **201**(6): 843-854.

Epstein, L. G., C. Kuiken, B. M. Blumberg, S. Hartman, L. R. Sharer, M. Clement and J. Goudsmit (1991). "HIV-1 V3 domain variation in brain and spleen of children with AIDS: tissue-specific evolution within host-determined quasispecies." *Virology* **180**(2): 583-590.

Eriksson, S., E. H. Graf, V. Dahl, M. C. Strain, S. A. Yukl, E. S. Lysenko, R. J. Bosch, J. Lai, S. Chioma, F. Emad, M. Abdel-Mohsen, R. Hoh, F. Hecht, P. Hunt, M. Somsouk, J. Wong, R. Johnston, R. F. Siliciano, D. D. Richman, U. O'Doherty, S. Palmer, S. G. Deeks and J. D. Siliciano (2013). "Comparative analysis of measures of viral reservoirs in HIV-1 eradication studies." *PLoS Pathog* **9**(2): e1003174.

Eyre, R. C., G. Zheng and A. A. Kiessling (2000). "Multiple drug resistance mutations in human immunodeficiency virus in semen but not blood of a man on antiretroviral therapy." *Urology* **55**(4): 591.

Fabre-Mersseman, V., J. Dutrieux, A. Louise, S. Rozlan, A. Lamine, R. Parker, M. Rancez, H. Nunes-Cabaco, A. E. Sousa, O. Lambotte and R. Cheynier (2011). "CD4(+) recent thymic emigrants are infected by HIV in vivo, implication for pathogenesis." *AIDS* **25**(9): 1153-1162.

Fassati, A. and S. P. Goff (2001). "Characterization of intracellular reverse transcription complexes of human immunodeficiency virus type 1." *J Virol* **75**(8): 3626-3635.

Favre, D., S. Lederer, B. Kanwar, Z. M. Ma, S. Proll, Z. Kasakow, J. Mold, L. Swainson, J. D. Barbour, C. R. Baskin, R. Palermo, I. Pandrea, C. J. Miller, M. G. Katze and J. M. McCune (2009). "Critical loss of the balance between Th17 and T regulatory cell populations in pathogenic SIV infection." *PLoS Pathog* **5**(2): e1000295.

Favre, D., J. Mold, P. W. Hunt, B. Kanwar, P. Loke, L. Seu, J. D. Barbour, M. M. Lowe, A. Jayawardene, F. Aweeka, Y. Huang, D. C. Douek, J. M. Brenchley, J. N. Martin, F. M. Hecht, S. G. Deeks and J. M. McCune (2010). "Tryptophan catabolism by indoleamine 2,3-dioxygenase 1 alters the balance of TH17 to regulatory T cells in HIV disease." *Sci Transl Med* **2**(32): 32ra36.

Feng, Y., T. T. Baig, R. P. Love and L. Chelico (2014). "Suppression of APOBEC3-mediated restriction of HIV-1 by Vif." *Front Microbiol* **5**: 450.

Fevrier, M., K. Dorgham and A. Rebollo (2011). "CD4+ T cell depletion in human immunodeficiency virus (HIV) infection: role of apoptosis." *Viruses* **3**(5): 586-612.

Fiebig, E. W., D. J. Wright, B. D. Rawal, P. E. Garrett, R. T. Schumacher, L. Peddada, C. Heldebrant, R. Smith, A. Conrad, S. H. Kleinman and M. P. Busch (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.

Finkel, T. H., G. Tudor-Williams, N. K. Banda, M. F. Cotton, T. Curiel, C. Monks, T. W. Baba, R. M. Ruprecht and A. Kupfer (1995). "Apoptosis occurs predominantly in bystander cells and not in productively infected cells of HIV- and SIV-infected lymph nodes." *Nat Med* **1**(2): 129-134.

Finzi, D., J. Blankson, J. D. Siliciano, J. B. Margolick, K. Chadwick, T. Pierson, K. Smith, J. Lisziewicz, F. Lori, C. Flexner, T. C. Quinn, R. E. Chaisson, E. Rosenberg, B. Walker, S. Gange, J. Gallant and R. F. Siliciano (1999). "Latent infection of CD4+ T cells provides a mechanism for lifelong persistence of HIV-1, even in patients on effective combination therapy." *Nat Med* **5**(5): 512-517.

Finzi, D., M. Hermankova, T. Pierson, L. M. Carruth, C. Buck, R. E. Chaisson, T. C. Quinn, K. Chadwick, J. Margolick, R. Brookmeyer, J. Gallant, M. Markowitz, D. D. Ho, D. D. Richman and R. F. Siliciano (1997). "Identification of a reservoir for HIV-1 in patients on highly active antiretroviral therapy." *Science* **278**(5341): 1295-1300.

Fisher, R. G., D. M. Smith, B. Murrell, R. Slabbert, B. M. Kirby, C. Edson, M. F. Cotton, R. H. Haubrich, S. L. Kosakovsky Pond and G. U. Van Zyl (2015). "Next generation sequencing improves detection of drug resistance mutations in infants after PMTCT failure." *J Clin Virol* **62**: 48-53.

Fletcher, C. V., K. Staskus, S. W. Wietgreffe, M. Rothenberger, C. Reilly, J. G. Chipman, G. J. Beilman, A. Khoruts, A. Thorkelson, T. E. Schmidt, J. Anderson, K. Perkey, M. Stevenson, A. S. Perelson, D. C. Douek, A. T. Haase and T. W. Schacker (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.

Fletcher, T. M., 3rd, B. Brichacek, N. Sharova, M. A. Newman, G. Stivahtis, P. M. Sharp, M. Emerman, B. H. Hahn and M. Stevenson (1996). "Nuclear import and cell cycle arrest functions of the HIV-1 Vpr protein are encoded by two separate genes in HIV-2/SIV(SM)." *EMBO J* **15**(22): 6155-6165.

Fontenot, J. D., M. A. Gavin and A. Y. Rudensky (2003). "Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells." *Nat Immunol* **4**(4): 330-336.

Franzolin, E., G. Pontarin, C. Rampazzo, C. Miazzi, P. Ferraro, E. Palumbo, P. Reichard and V. Bianchi (2013). "The deoxynucleotide triphosphohydrolase SAMHD1 is a major regulator of DNA precursor pools in mammalian cells." Proc Natl Acad Sci U S A **110**(35): 14272-14277.

Freed, E. O. (2015). "HIV-1 assembly, release and maturation." Nat Rev Microbiol **13**(8): 484-496.

Freeman, G. J., E. J. Wherry, R. Ahmed and A. H. Sharpe (2006). "Reinvigorating exhausted HIV-specific T cells via PD-1-PD-1 ligand blockade." J Exp Med **203**(10): 2223-2227.

Fritzsching, B., N. Oberle, N. Eberhardt, S. Quick, J. Haas, B. Wildemann, P. H. Krammer and E. Suri-Payer (2005). "In contrast to effector T cells, CD4+CD25+FoxP3+ regulatory T cells are highly susceptible to CD95 ligand- but not to TCR-mediated cell death." J Immunol **175**(1): 32-36.

Fukazawa, Y., R. Lum, A. A. Okoye, H. Park, K. Matsuda, J. Y. Bae, S. I. Hagen, R. Shoemaker, C. Deleage, C. Lucero, D. Morcock, T. Swanson, A. W. Legasse, M. K. Axthelm, J. Hesselgesser, R. Geleziunas, V. M. Hirsch, P. T. Edlefsen, M. Piatak, Jr., J. D. Estes, J. D. Lifson and L. J. Picker (2015). "B cell follicle sanctuary permits persistent productive simian immunodeficiency virus infection in elite controllers." Nat Med **21**(2): 132-139.

Fulcher, J. A., Y. Hwangbo, R. Zioni, D. Nickle, X. Lin, L. Heath, J. I. Mullins, L. Corey and T. Zhu (2004). "Compartmentalization of human immunodeficiency virus type 1 between blood monocytes and CD4+ T cells during infection." J Virol **78**(15): 7883-7893.

Fun, A., H. P. Mok, M. R. Wills and A. M. Lever (2017). "A highly reproducible quantitative viral outgrowth assay for the measurement of the replication-competent latent HIV-1 reservoir." Sci Rep **7**: 43231.

Galloway, N. L., G. Doitsh, K. M. Monroe, Z. Yang, I. Munoz-Arias, D. N. Levy and W. C. Greene (2015). "Cell-to-Cell Transmission of HIV-1 Is Required to Trigger Pyroptotic Death of Lymphoid-Tissue-Derived CD4 T Cells." Cell Rep **12**(10): 1555-1563.

Gattinoni, L., E. Lugli, Y. Ji, Z. Pos, C. M. Paulos, M. F. Quigley, J. R. Almeida, E. Gostick, Z. Yu, C. Carpenito, E. Wang, D. C. Douek, D. A. Price, C. H. June, F. M. Marincola, M. Roederer and N. P. Restifo (2011). "A human memory T cell subset with stem cell-like properties." Nat Med **17**(10): 1290-1297.

Geginat, J., F. Sallusto and A. Lanzavecchia (2003). "Cytokine-driven proliferation and differentiation of human naive, central memory and effector memory CD4+ T cells." Pathol Biol (Paris) **51**(2): 64-66.

Geijtenbeek, T. B., D. S. Kwon, R. Torensma, S. J. van Vliet, G. C. van Duijnhoven, J. Middel, I. L. Cornelissen, H. S. Nottet, V. N. KewalRamani, D. R. Littman, C. G. Figdor and Y. van Kooyk (2000). "DC-SIGN, a dendritic cell-specific HIV-1-binding protein that enhances trans-infection of T cells." Cell **100**(5): 587-597.

Gendelman, H. E., J. M. Orenstein, M. A. Martin, C. Ferrua, R. Mitra, T. Phipps, L. A. Wahl, H. C. Lane, A. S. Fauci, D. S. Burke and et al. (1988). "Efficient isolation and propagation of human immunodeficiency virus on recombinant colony-stimulating factor 1-treated monocytes." J Exp Med **167**(4): 1428-1441.

Ghosn, J., J. P. Viard, C. Katlama, M. de Almeida, R. Tubiana, F. Letourneur, L. Aaron, C. Goujard, D. Salmon, M. Leruez-Ville, C. Rouzioux and M. L. Chaix (2004). "Evidence of genotypic resistance diversity of archived and circulating viral strains in blood and semen of pre-treated HIV-infected men." AIDS **18**(3): 447-457.

Gianella, S., S. L. Kosakovsky Pond, M. F. Oliveira, K. Scheffler, M. C. Strain, A. De la Torre, S. Letendre, D. M. Smith and R. J. Ellis (2016). "Compartmentalized HIV rebound in the

central nervous system after interruption of antiretroviral therapy." *Virus Evol* **2**(2): vew020.

Gianella, S., S. R. Mehta, M. C. Strain, J. A. Young, M. V. Vargas, S. J. Little, D. D. Richman, S. L. Kosakovsky Pond and D. M. Smith (2012). "Impact of seminal cytomegalovirus replication on HIV-1 dynamics between blood and semen." *J Med Virol* **84**(11): 1703-1709.

Gilles, A., E. Meglec, N. Pech, S. Ferreira, T. Malausa and J. F. Martin (2011). "Accuracy and quality assessment of 454 GS-FLX Titanium pyrosequencing." *BMC Genomics* **12**: 245.

Gloster, S. E., P. Newton, D. Cornforth, J. D. Lifson, I. Williams, G. M. Shaw and P. Borrow (2004). "Association of strong virus-specific CD4 T cell responses with efficient natural control of primary HIV-1 infection." *AIDS* **18**(5): 749-755.

Goldstone, D. C., V. Ennis-Adeniran, J. J. Hedden, H. C. Groom, G. I. Rice, E. Christodoulou, P. A. Walker, G. Kelly, L. F. Haire, M. W. Yap, L. P. de Carvalho, J. P. Stoye, Y. J. Crow, I. A. Taylor and M. Webb (2011). "HIV-1 restriction factor SAMHD1 is a deoxynucleoside triphosphate triphosphohydrolase." *Nature* **480**(7377): 379-382.

Goncalves, A., E. Karayel, G. I. Rice, K. L. Bennett, Y. J. Crow, G. Superti-Furga and T. Burckstummer (2012). "SAMHD1 is a nucleic-acid binding protein that is mislocalized due to aicardi-goutieres syndrome-associated mutations." *Hum Mutat* **33**(7): 1116-1122.

Gordon-Alonso, M., M. Yanez-Mo, O. Barreiro, S. Alvarez, M. A. Munoz-Fernandez, A. Valenzuela-Fernandez and F. Sanchez-Madrid (2006). "Tetraspanins CD9 and CD81 modulate HIV-1-induced membrane fusion." *J Immunol* **177**(8): 5129-5137.

Gosselin, A., P. Monteiro, N. Chomont, F. Diaz-Griffero, E. A. Said, S. Fonseca, V. Wacleche, M. El-Far, M. R. Boulassel, J. P. Routy, R. P. Sekaly and P. Ancuta (2010). "Peripheral blood CCR4+CCR6+ and CXCR3+CCR6+CD4+ T cells are highly permissive to HIV-1 infection." *J Immunol* **184**(3): 1604-1616.

Gosselin, A., T. R. Wiche Salinas, D. Planas, V. S. Wacleche, Y. Zhang, R. Fromentin, N. Chomont, E. A. Cohen, B. Shacklett, V. Mehraj, M. P. Ghali, J. P. Routy and P. Ancuta (2017). "HIV persists in CCR6+CD4+ T cells from colon and blood during antiretroviral therapy." *AIDS* **31**(1): 35-48.

Gottlieb, M. S., R. Schroff, H. M. Schanker, J. D. Weisman, P. T. Fan, R. A. Wolf and A. Saxon (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.

Goudsmit, J., J. A. Bogaards, S. Jurriaans, H. Schuitemaker, J. M. Lange, R. A. Coutinho and G. J. Weverling (2002). "Naturally HIV-1 seroconverters with lowest viral load have best prognosis, but in time lose control of viraemia." *AIDS* **16**(5): 791-793.

Gougeon, M. L. and L. Montagnier (1999). "Programmed cell death as a mechanism of CD4 and CD8 T cell deletion in AIDS. Molecular control and effect of highly active anti-retroviral therapy." *Ann N Y Acad Sci* **887**: 199-212.

Goujon, C., V. Arfi, T. Pertel, J. Luban, J. Lienard, D. Rigal, J. L. Darlix and A. Cimorelli (2008). "Characterization of simian immunodeficiency virus SIVSM/human immunodeficiency virus type 2 Vpx function in human myeloid cells." *J Virol* **82**(24): 12335-12345.

Goujon, C., L. Jarrosson-Wuilleme, J. Bernaud, D. Rigal, J. L. Darlix and A. Cimorelli (2006). "With a little help from a friend: increasing HIV transduction of monocyte-derived dendritic cells with virion-like particles of SIV(MAC)." *Gene Ther* **13**(12): 991-994.

Gramberg, T., T. Kahle, N. Bloch, S. Wittmann, E. Mullers, W. Daddacha, H. Hofmann, B. Kim, D. Lindemann and N. R. Landau (2013). "Restriction of diverse retroviruses by SAMHD1." *Retrovirology* **10**: 26.

Gratton, S., R. Cheynier, M. J. Dumaurier, E. Oksenhendler and S. Wain-Hobson (2000). "Highly restricted spread of HIV-1 and multiply infected cells within splenic germinal centers." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(26): 14566-14571.

Greene, W. C. and B. M. Peterlin (2002). "Charting HIV's remarkable voyage through the cell: Basic science as a passport to future therapy." *Nat Med* **8**(7): 673-680.

Groot, F., S. Welsch and Q. J. Sattentau (2008). "Efficient HIV-1 transmission from macrophages to T cells across transient virological synapses." *Blood* **111**(9): 4660-4663.

Grossman, Z., M. Meier-Schellersheim, W. E. Paul and L. J. Picker (2006). "Pathogenesis of HIV infection: what the virus spares is as important as what it destroys." *Nat Med* **12**(3): 289-295.

Groux, H., G. Torpier, D. Monte, Y. Mouton, A. Capron and J. C. Ameisen (1992). "Activation-induced death by apoptosis in CD4+ T cells from human immunodeficiency virus-infected asymptomatic individuals." *J Exp Med* **175**(2): 331-340.

Grutter, M. G. and J. Luban (2012). "TRIM5 structure, HIV-1 capsid recognition, and innate immune signaling." *Curr Opin Virol* **2**(2): 142-150.

Guihot, A., A. Bourgarit, G. Carcelain and B. Autran (2011). "Immune reconstitution after a decade of combined antiretroviral therapies for human immunodeficiency virus." *Trends Immunol* **32**(3): 131-137.

Haase, A. T. (1999). "Population biology of HIV-1 infection: viral and CD4+ T cell demographics and dynamics in lymphatic tissues." *Annu Rev Immunol* **17**: 625-656.

Haggerty, S. and M. Stevenson (1991). "Predominance of distinct viral genotypes in brain and lymph node compartments of HIV-1-infected individuals." *Viral Immunol* **4**(2): 123-131.

Hahn, B. H., G. M. Shaw, K. M. De Cock and P. M. Sharp (2000). "AIDS as a zoonosis: scientific and public health implications." *Science* **287**(5453): 607-614.

Haim-Boukobza, S., L. Morand-Joubert, P. Flandre, N. Valin, S. Fourati, S. Sayon, M. Lavignon, A. Simon, P. M. Girard, C. Katlama, V. Calvez and A. G. Marcelin (2011). "Higher efficacy of nevirapine than efavirenz to achieve HIV-1 plasma viral load below 1 copy/ml." *AIDS* **25**(3): 341-344.

Han, Y., K. Lassen, D. Monie, A. R. Sedaghat, S. Shimoji, X. Liu, T. C. Pierson, J. B. Margolick, R. F. Siliciano and J. D. Siliciano (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.

Hansen, E. C., K. J. Seamon, S. L. Cravens and J. T. Stivers (2014). "GTP activator and dNTP substrates of HIV-1 restriction factor SAMHD1 generate a long-lived activated state." *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**(18): E1843-1851.

Harrington, L. E., R. D. Hatton, P. R. Mangan, H. Turner, T. L. Murphy, K. M. Murphy and C. T. Weaver (2005). "Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages." *Nat Immunol* **6**(11): 1123-1132.

Harrington, P. R., G. Schnell, S. L. Letendre, K. Ritola, K. Robertson, C. Hall, C. L. Burch, C. B. Jabara, D. T. Moore, R. J. Ellis, R. W. Price and R. Swanstrom (2009). "Cross-sectional characterization of HIV-1 env compartmentalization in cerebrospinal fluid over the full disease course." *AIDS* **23**(8): 907-915.

Hatano, H., V. Jain, P. W. Hunt, T. H. Lee, E. Sinclair, T. D. Do, R. Hoh, J. N. Martin, J. M. McCune, F. Hecht, M. P. Busch and S. G. Deeks (2013). "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* **208**(1): 50-56.

Hemelaar, J. (2012). "The origin and diversity of the HIV-1 pandemic." *Trends Mol Med* **18**(3): 182-192.

Hemelaar, J., E. Gouws, P. D. Ghys and S. Osmanov (2006). "Global and regional distribution of HIV-1 genetic subtypes and recombinants in 2004." *AIDS* **20**(16): W13-23.

Hermankova, M., J. D. Siliciano, Y. Zhou, D. Monie, K. Chadwick, J. B. Margolick, T. C. Quinn and R. F. Siliciano (2003). "Analysis of human immunodeficiency virus type 1 gene expression in latently infected resting CD4+ T lymphocytes in vivo." *J Virol* **77**(13): 7383-7392.

Hiener, B., B. A. Horsburgh, J. S. Eden, K. Barton, T. E. Schlub, E. Lee, S. von Stockenström, L. Odevall, J. M. Milush, T. Liegler, E. Sinclair, R. Hoh, E. A. Boritz, D. Douek, R. Fromentin, N. Chomont, S. G. Deeks, F. M. Hecht and S. Palmer (2017). "Identification of Genetically Intact HIV-1 Proviruses in Specific CD4(+) T Cells from Effectively Treated Participants." *Cell Rep* **21**(3): 813-822.

Hirsch, V. M., M. E. Sharkey, C. R. Brown, B. Brichacek, S. Goldstein, J. Wakefield, R. Byrum, W. R. Elkins, B. H. Hahn, J. D. Lifson and M. Stevenson (1998). "Vpx is required for dissemination and pathogenesis of SIV(SM) PBj: evidence of macrophage-dependent viral amplification." *Nat Med* **4**(12): 1401-1408.

Ho, Y. C., L. Shan, N. N. Hosmane, J. Wang, S. B. Laskey, D. I. Rosenbloom, J. Lai, J. N. Blankson, J. D. Siliciano and R. F. Siliciano (2013). "Replication-competent noninduced proviruses in the latent reservoir increase barrier to HIV-1 cure." *Cell* **155**(3): 540-551.

Hori, S., T. Nomura and S. Sakaguchi (2003). "Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3." *Science* **299**(5609): 1057-1061.

Horiike, M., S. Iwami, M. Kodama, A. Sato, Y. Watanabe, M. Yasui, Y. Ishida, T. Kobayashi, T. Miura and T. Igarashi (2012). "Lymph nodes harbor viral reservoirs that cause rebound of plasma viremia in SIV-infected macaques upon cessation of combined antiretroviral therapy." *Virology* **423**(2): 107-118.

Hosmane, N. N., K. J. Kwon, K. M. Bruner, A. A. Capoferri, S. Beg, D. I. Rosenbloom, B. F. Keele, Y. C. Ho, J. D. Siliciano and R. F. Siliciano (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.

Hrecka, K., C. Hao, M. Gierszewska, S. K. Swanson, M. Kesik-Brodacka, S. Srivastava, L. Florens, M. P. Washburn and J. Skowronski (2011). "Vpx relieves inhibition of HIV-1 infection of macrophages mediated by the SAMHD1 protein." *Nature* **474**(7353): 658-661.

Hu, J., M. B. Gardner and C. J. Miller (2000). "Simian immunodeficiency virus rapidly penetrates the cervicovaginal mucosa after intravaginal inoculation and infects intraepithelial dendritic cells." *J Virol* **74**(13): 6087-6095.

Hu, W. S. and S. H. Hughes (2012). "HIV-1 reverse transcription." *Cold Spring Harb Perspect Med* **2**(10).

Huang, W., L. Na, P. L. Fidel and P. Schwarzenberger (2004). "Requirement of interleukin-17A for systemic anti-Candida albicans host defense in mice." *J Infect Dis* **190**(3): 624-631.

Hughes, E. S., J. E. Bell and P. Simmonds (1997). "Investigation of the dynamics of the spread of human immunodeficiency virus to brain and other tissues by evolutionary analysis of sequences from the p17gag and env genes." *J Virol* **71**(2): 1272-1280.

Hutter, G., D. Nowak, M. Mossner, S. Ganepola, A. Mussig, K. Allers, T. Schneider, J. Hofmann, C. Kucherer, O. Blau, I. W. Blau, W. K. Hofmann and E. Thiel (2009). "Long-term control of HIV by CCR5 Delta32/Delta32 stem-cell transplantation." N Engl J Med **360**(7): 692-698.

Imamichi, H., R. L. Dewar, J. W. Adelsberger, C. A. Rehm, U. O'Doherty, E. E. Paxinos, A. S. Fauci and H. C. Lane (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.

International, A. S. S. W. G. o. H. I. V. C., S. G. Deeks, B. Autran, B. Berkhout, M. Benkirane, S. Cairns, N. Chomont, T. W. Chun, M. Churchill, M. Di Mascio, C. Katlama, A. Lafeuillade, A. Landay, M. Lederman, S. R. Lewin, F. Maldarelli, D. Margolis, M. Markowitz, J. Martinez-Picado, J. I. Mullins, J. Mellors, S. Moreno, U. O'Doherty, S. Palmer, M. C. Penicaud, M. Peterlin, G. Poli, J. P. Routy, C. Rouzioux, G. Silvestri, M. Stevenson, A. Telenti, C. Van Lint, E. Verdin, A. Woolfrey, J. Zaia and F. Barre-Sinoussi (2012). "Towards an HIV cure: a global scientific strategy." Nat Rev Immunol **12**(8): 607-614.

Iwabu, Y., H. Fujita, M. Kinomoto, K. Kaneko, Y. Ishizaka, Y. Tanaka, T. Sata and K. Tokunaga (2009). "HIV-1 accessory protein Vpu internalizes cell-surface BST-2/tetherin through transmembrane interactions leading to lysosomes." J Biol Chem **284**(50): 35060-35072.

Iwasaki, A. (2007). "Mucosal dendritic cells." Annu Rev Immunol **25**: 381-418.

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

Jambo, K. C., D. H. Banda, A. M. Kankwatira, N. Sukumar, T. J. Allain, R. S. Heyderman, D. G. Russell and H. C. Mwandumba (2014). "Small alveolar macrophages are infected preferentially by HIV and exhibit impaired phagocytic function." Mucosal Immunol **7**(5): 1116-1126.

Ji, X., C. Tang, Q. Zhao, W. Wang and Y. Xiong (2014). "Structural basis of cellular dNTP regulation by SAMHD1." Proc Natl Acad Sci U S A **111**(41): E4305-4314.

Ji, X., Y. Wu, J. Yan, J. Mehrens, H. Yang, M. DeLucia, C. Hao, A. M. Gronenborn, J. Skowronski, J. Ahn and Y. Xiong (2013). "Mechanism of allosteric activation of SAMHD1 by dGTP." Nat Struct Mol Biol **20**(11): 1304-1309.

Jia, X., Q. Zhao and Y. Xiong (2015). "HIV suppression by host restriction factors and viral immune evasion." Curr Opin Struct Biol **31**: 106-114.

Jin, C., X. Peng, F. Liu, L. Cheng, X. Lu, H. Yao, H. Wu and N. Wu (2014). "MicroRNA-181 expression regulates specific post-transcriptional level of SAMHD1 expression in vitro." Biochem Biophys Res Commun **452**(3): 760-767.

Johnston, J. A., C. M. Bacon, M. C. Riedy and J. J. O'Shea (1996). "Signaling by IL-2 and related cytokines: JAKs, STATs, and relationship to immunodeficiency." J Leukoc Biol **60**(4): 441-452.

Johnston, M. I. and A. S. Fauci (2007). "An HIV vaccine--evolving concepts." N Engl J Med **356**(20): 2073-2081.

Jolly, C. (2011). "Cell-to-cell transmission of retroviruses: Innate immunity and interferon-induced restriction factors." Virology **411**(2): 251-259.

Jolly, C., K. Kashefi, M. Hollinshead and Q. J. Sattentau (2004). "HIV-1 cell to cell transfer across an Env-induced, actin-dependent synapse." J Exp Med **199**(2): 283-293.

Jolly, C., I. Mitar and Q. J. Sattentau (2007). "Adhesion molecule interactions facilitate human immunodeficiency virus type 1-induced virological synapse formation between T cells." *J Virol* **81**(24): 13916-13921.

Jolly, C. and Q. J. Sattentau (2004). "Retroviral spread by induction of virological synapses." *Traffic* **5**(9): 643-650.

Jolly, C. and Q. J. Sattentau (2007). "Human immunodeficiency virus type 1 assembly, budding, and cell-cell spread in T cells take place in tetraspanin-enriched plasma membrane domains." *J Virol* **81**(15): 7873-7884.

Josefsson, L., M. S. King, B. Makitalo, J. Brannstrom, W. Shao, F. Maldarelli, M. F. Kearney, W. S. Hu, J. Chen, H. Gaines, J. W. Mellors, J. Albert, J. M. Coffin and S. E. Palmer (2011). "Majority of CD4+ T cells from peripheral blood of HIV-1-infected individuals contain only one HIV DNA molecule." *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**(27): 11199-11204.

Josefsson, L., S. von Stockenstrom, N. R. Faria, E. Sinclair, P. Bacchetti, M. Killian, L. Epling, A. Tan, T. Ho, P. Lemey, W. Shao, P. W. Hunt, M. Somsouk, W. Wylie, D. C. Douek, L. Loeb, J. Custer, R. Hoh, L. Poole, S. G. Deeks, F. Hecht and S. Palmer (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.

Kahn, J. O. and B. D. Walker (1998). "Acute human immunodeficiency virus type 1 infection." *N Engl J Med* **339**(1): 33-39.

Kaiser, P., S. K. Joshi, P. Kim, P. Li, H. Liu, A. P. Rice, J. K. Wong and S. A. Yukl (2017). "Assays for precise quantification of total (including short) and elongated HIV-1 transcripts." *J Virol Methods* **242**: 1-8.

Kaliyadan, F. (2008). "Hiv and lupus erythematosus: a diagnostic dilemma." *Indian J Dermatol* **53**(2): 80-82.

Kane, M., S. V. Rebenburg, M. A. Takata, T. M. Zang, M. Yamashita, M. Kvaratskhelia and P. D. Bieniasz (2018). "Nuclear pore heterogeneity influences HIV-1 infection and the antiviral activity of MX2." *Elife* **7**.

Karlsson Hedestam, G. B., R. A. Fouchier, S. Phogat, D. R. Burton, J. Sodroski and R. T. Wyatt (2008). "The challenges of eliciting neutralizing antibodies to HIV-1 and to influenza virus." *Nat Rev Microbiol* **6**(2): 143-155.

Karris, M. A. and D. M. Smith (2011). "Tissue-specific HIV-1 infection: why it matters." *Future Virol* **6**(7): 869-882.

Kauder, S. E., A. Bosque, A. Lindqvist, V. Planelles and E. Verdin (2009). "Epigenetic regulation of HIV-1 latency by cytosine methylation." *PLoS Pathog* **5**(6): e1000495.

Kaufmann, D. E., D. G. Kavanagh, F. Pereyra, J. J. Zaunders, E. W. Mackey, T. Miura, S. Palmer, M. Brockman, A. Rathod, A. Piechocka-Trocha, B. Baker, B. Zhu, S. Le Gall, M. T. Waring, R. Ahern, K. Moss, A. D. Kelleher, J. M. Coffin, G. J. Freeman, E. S. Rosenberg and B. D. Walker (2007). "Upregulation of CTLA-4 by HIV-specific CD4+ T cells correlates with disease progression and defines a reversible immune dysfunction." *Nat Immunol* **8**(11): 1246-1254.

Kaul, R., C. Pettengell, P. M. Sheth, S. Sunderji, A. Biringer, K. MacDonald, S. Walmsley and A. Rebbapragada (2008). "The genital tract immune milieu: an important determinant of HIV susceptibility and secondary transmission." *J Reprod Immunol* **77**(1): 32-40.

Kaushik, R., X. Zhu, R. Stranska, Y. Wu and M. Stevenson (2009). "A cellular restriction dictates the permissivity of nondividing monocytes/macrophages to lentivirus and gammaretrovirus infection." *Cell Host Microbe* **6**(1): 68-80.

Kearney, M. F., A. Wiegand, W. Shao, J. M. Coffin, J. W. Mellors, M. Lederman, R. T. Gandhi, B. F. Keele and J. Z. Li (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.

Keele, B. F., L. Tazi, S. Gartner, Y. Liu, T. B. Burgon, J. D. Estes, T. C. Thacker, K. A. Crandall, J. C. McArthur and G. F. Burton (2008). "Characterization of the follicular dendritic cell reservoir of human immunodeficiency virus type 1." *J Virol* **82**(11): 5548-5561.

Keele, B. F., F. Van Heuverswyn, Y. Li, E. Bailes, J. Takehisa, M. L. Santiago, F. Bibollet-Ruche, Y. Chen, L. V. Wain, F. Liegeois, S. Loul, E. M. Ngole, Y. Bienvenue, E. Delaporte, J. F. Brookfield, P. M. Sharp, G. M. Shaw, M. Peeters and B. H. Hahn (2006). "Chimpanzee reservoirs of pandemic and nonpandemic HIV-1." *Science* **313**(5786): 523-526.

Khaitan, A. and D. Unutmaz (2011). "Revisiting immune exhaustion during HIV infection." *Curr HIV/AIDS Rep* **8**(1): 4-11.

Khoury, G., J. L. Anderson, R. Fromentin, W. Hartogenesis, M. Z. Smith, P. Bacchetti, F. M. Hecht, N. Chomont, P. U. Cameron, S. G. Deeks and S. R. Lewin (2016). "Persistence of integrated HIV DNA in CXCR3 + CCR6 + memory CD4+ T cells in HIV-infected individuals on antiretroviral therapy." *AIDS* **30**(10): 1511-1520.

Kiessling, A. A., L. M. Fitzgerald, D. Zhang, H. Chhay, D. Brettler, R. C. Eyre, J. Steinberg, K. McGowan and R. A. Byrn (1998). "Human immunodeficiency virus in semen arises from a genetically distinct virus reservoir." *AIDS Res Hum Retroviruses* **14** **Suppl 1**: S33-41.

Kim, B., L. A. Nguyen, W. Daddacha and J. A. Hollenbaugh (2012). "Tight interplay among SAMHD1 protein level, cellular dNTP levels, and HIV-1 proviral DNA synthesis kinetics in human primary monocyte-derived macrophages." *J Biol Chem* **287**(26): 21570-21574.

Kim, C. A. and J. U. Bowie (2003). "SAM domains: uniform structure, diversity of function." *Trends Biochem Sci* **28**(12): 625-628.

Kim, R. B., M. F. Fromm, C. Wandel, B. Leake, A. J. Wood, D. M. Roden and G. R. Wilkinson (1998). "The drug transporter P-glycoprotein limits oral absorption and brain entry of HIV-1 protease inhibitors." *J Clin Invest* **101**(2): 289-294.

Klarmann, G. J., X. Chen, T. W. North and B. D. Preston (2003). "Incorporation of uracil into minus strand DNA affects the specificity of plus strand synthesis initiation during lentiviral reverse transcription." *J Biol Chem* **278**(10): 7902-7909.

Klasse, P. J. (2012). "The molecular basis of HIV entry." *Cell Microbiol* **14**(8): 1183-1192.

Klatt, N. R. and J. M. Brenchley (2010). "Th17 cell dynamics in HIV infection." *Curr Opin HIV AIDS* **5**(2): 135-140.

Klatt, N. R., N. Chomont, D. C. Douek and S. G. Deeks (2013). "Immune activation and HIV persistence: implications for curative approaches to HIV infection." *Immunol Rev* **254**(1): 326-342.

Klatt, N. R., N. T. Funderburg and J. M. Brenchley (2013). "Microbial translocation, immune activation, and HIV disease." *Trends Microbiol* **21**(1): 6-13.

Klatzmann, D., E. Champagne, S. Chamaret, J. Gruest, D. Guetard, T. Hercend, J. C. Gluckman and L. Montagnier (1984). "T-lymphocyte T4 molecule behaves as the receptor for human retrovirus LAV." *Nature* **312**(5996): 767-768.

Klenerman, P. and A. Hill (2005). "T cells and viral persistence: lessons from diverse infections." *Nat Immunol* **6**(9): 873-879.

Koelsch, K. K., L. Liu, R. Haubrich, S. May, D. Havlir, H. F. Gunthard, C. C. Ignacio, P. Campos-Soto, S. J. Little, R. Shafer, G. K. Robbins, R. T. D'Aquila, Y. Kawano, K. Young, P. Dao, C. A. Spina, D. D. Richman and J. K. Wong (2008). "Dynamics of total, linear nonintegrated, and integrated HIV-1 DNA in vivo and in vitro." *J Infect Dis* **197**(3): 411-419.

Koenig, S., H. E. Gendelman, J. M. Orenstein, M. C. Dal Canto, G. H. Pezeshkpour, M. Yungbluth, F. Janotta, A. Aksamit, M. A. Martin and A. S. Fauci (1986). "Detection of AIDS virus in macrophages in brain tissue from AIDS patients with encephalopathy." Science **233**(4768): 1089-1093.

Koharudin, L. M., Y. Wu, M. DeLucia, J. Mehrens, A. M. Gronenborn and J. Ahn (2014). "Structural basis of allosteric activation of sterile alpha motif and histidine-aspartate domain-containing protein 1 (SAMHD1) by nucleoside triphosphates." J Biol Chem **289**(47): 32617-32627.

Kohler, S. L., M. N. Pham, J. M. Folkvord, T. Arends, S. M. Miller, B. Miles, A. L. Meditz, M. McCarter, D. N. Levy and E. Connick (2016). "Germinal Center T Follicular Helper Cells Are Highly Permissive to HIV-1 and Alter Their Phenotype during Virus Replication." J Immunol **196**(6): 2711-2722.

Kok, A., L. Hocqueloux, H. Hocini, M. Carriere, L. Lefrou, A. Guguin, P. Tisserand, H. Bonabau, V. Avettand-Fenoel, T. Prazuck, S. Katsahian, P. Gaulard, R. Thiebaut, Y. Levy and S. Hue (2015). "Early initiation of combined antiretroviral therapy preserves immune function in the gut of HIV-infected patients." Mucosal Immunol **8**(1): 127-140.

Kondrack, R. M., J. Harbertson, J. T. Tan, M. E. McBreen, C. D. Surh and L. M. Bradley (2003). "Interleukin 7 regulates the survival and generation of memory CD4 cells." J Exp Med **198**(12): 1797-1806.

Koppensteiner, H., R. Brack-Werner and M. Schindler (2012). "Macrophages and their relevance in Human Immunodeficiency Virus Type I infection." Retrovirology **9**: 82.

Korber, B., B. Gaschen, K. Yusim, R. Thakallapally, C. Kesmir and V. Detours (2001). "Evolutionary and immunological implications of contemporary HIV-1 variation." Br Med Bull **58**: 19-42.

Koup, R. A., J. T. Safrit, Y. Cao, C. A. Andrews, G. McLeod, W. Borkowsky, C. Farthing and D. D. Ho (1994). "Temporal association of cellular immune responses with the initial control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 syndrome." J Virol **68**(7): 4650-4655.

Kovacs, A., S. S. Wasserman, D. Burns, D. J. Wright, J. Cohn, A. Landay, K. Weber, M. Cohen, A. Levine, H. Minkoff, P. Miotti, J. Palefsky, M. Young, P. Reichelderfer, D. S. Group and W. S. Group (2001). "Determinants of HIV-1 shedding in the genital tract of women." Lancet **358**(9293): 1593-1601.

Kretschmer, S., C. Wolf, N. Konig, W. Staroske, J. Guck, M. Hausler, H. Luksch, L. A. Nguyen, B. Kim, D. Alexopoulou, A. Dahl, A. Rapp, M. C. Cardoso, A. Shevchenko and M. A. Lee-Kirsch (2015). "SAMHD1 prevents autoimmunity by maintaining genome stability." Ann Rheum Dis **74**(3): e17.

Kreutzberg, G. W. (1996). "Microglia: a sensor for pathological events in the CNS." Trends Neurosci **19**(8): 312-318.

Krishnan, L. and A. Engelman (2012). "Retroviral integrase proteins and HIV-1 DNA integration." J Biol Chem **287**(49): 40858-40866.

Kulpa, D. A. and N. Chomont (2015). "HIV persistence in the setting of antiretroviral therapy: when, where and how does HIV hide?" J Virus Erad **1**(2): 59-66.

Kumar, A., W. Abbas and G. Herbein (2014). "HIV-1 latency in monocytes/macrophages." Viruses **6**(4): 1837-1860.

Kumar, A. and G. Herbein (2014). "The macrophage: a therapeutic target in HIV-1 infection." Mol Cell Ther **2**: 10.

Kuzmichev, Y. V., R. T. Veenhuis, C. W. Pohlmeier, C. C. Garliss, V. E. Walker-Sperling and J. N. Blankson (2017). "A CD3/CD28 microbead-based HIV-1 viral outgrowth assay." J Virus Erad **3**(2): 85-89.

Kuznetsov, Y. G., J. G. Victoria, W. E. Robinson, Jr. and A. McPherson (2003). "Atomic force microscopy investigation of human immunodeficiency virus (HIV) and HIV-infected lymphocytes." *J Virol* **77**(22): 11896-11909.

Lackner, A. A. and R. S. Veazey (2007). "Current concepts in AIDS pathogenesis: insights from the SIV/maaque model." *Annu Rev Med* **58**: 461-476.

Lafeuillade, A., C. Poggi, C. Tamalet and N. Profizi (1997). "Human immunodeficiency virus type 1 dynamics in different lymphoid tissue compartments." *J Infect Dis* **176**(3): 804-806.

Laguet, N., B. Sobhian, N. Casartelli, M. Ringard, C. Chable-Bessia, E. Segeral, A. Yatim, S. Emiliani, O. Schwartz and M. Benkirane (2011). "SAMHD1 is the dendritic- and myeloid-cell-specific HIV-1 restriction factor counteracted by Vpx." *Nature* **474**(7353): 654-657.

Lahouassa, H., W. Daddacha, H. Hofmann, D. Ayinde, E. C. Logue, L. Dragin, N. Bloch, C. Maudet, M. Bertrand, T. Gramberg, G. Pancino, S. Priet, B. Canard, N. Laguet, M. Benkirane, C. Transy, N. R. Landau, B. Kim and F. Margottin-Goguet (2012). "SAMHD1 restricts the replication of human immunodeficiency virus type 1 by depleting the intracellular pool of deoxynucleoside triphosphates." *Nat Immunol* **13**(3): 223-228.

Laird, G. M., E. E. Eisele, S. A. Rabi, J. Lai, S. Chioma, J. N. Blankson, J. D. Siliciano and R. F. Siliciano (2013). "Rapid quantification of the latent reservoir for HIV-1 using a viral outgrowth assay." *PLoS Pathog* **9**(5): e1003398.

Laird, G. M., D. I. Rosenbloom, J. Lai, R. F. Siliciano and J. D. Siliciano (2016). "Measuring the Frequency of Latent HIV-1 in Resting CD4(+) T Cells Using a Limiting Dilution Coculture Assay." *Methods Mol Biol* **1354**: 239-253.

Lambotte, O., Y. Taoufik, M. G. de Goer, C. Wallon, C. Goujard and J. F. Delfraissy (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.

Lamers, S. L., R. R. Gray, M. Salemi, L. C. Huysentruyt and M. S. McGrath (2011). "HIV-1 phylogenetic analysis shows HIV-1 transits through the meninges to brain and peripheral tissues." *Infect Genet Evol* **11**(1): 31-37.

Lamers, S. L., R. Rose, E. Maidji, M. Agsalda-Garcia, D. J. Nolan, G. B. Fogel, M. Salemi, D. L. Garcia, P. Bracci, W. Yong, D. Commins, J. Said, N. Khanlou, C. H. Hinkin, M. V. Sueiras, G. Mathisen, S. Donovan, B. Shiramizu, C. A. Stoddart, M. S. McGrath and E. J. Singer (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.

Lamers, S. L., M. Salemi, M. S. McGrath and G. B. Fogel (2008). "Prediction of R5, X4, and R5X4 HIV-1 coreceptor usage with evolved neural networks." *IEEE/ACM Trans Comput Biol Bioinform* **5**(2): 291-300.

Lauring, A. S. and R. Andino (2010). "Quasispecies theory and the behavior of RNA viruses." *PLoS Pathog* **6**(7): e1001005.

Lebon, P., J. Badoual, G. Ponsot, F. Goutieres, F. Hemeury-Cukier and J. Aicardi (1988). "Intrathecal synthesis of interferon-alpha in infants with progressive familial encephalopathy." *J Neurol Sci* **84**(2-3): 201-208.

Lecossier, D., F. Bouchonnet, F. Clavel and A. J. Hance (2003). "Hypermutation of HIV-1 DNA in the absence of the Vif protein." *Science* **300**(5622): 1112.

Lee, G. Q., N. Orlova-Fink, K. Einkauf, F. Z. Chowdhury, X. Sun, S. Harrington, H. H. Kuo, S. Hua, H. R. Chen, Z. Ouyang, K. Reddy, K. Dong, T. Ndung'u, B. D. Walker, E. S. Rosenberg, X. G. Yu and M. Lichterfeld (2017). "Clonal expansion of genome-intact HIV-1 in functionally polarized Th1 CD4+ T cells." *J Clin Invest* **127**(7): 2689-2696.

Lee, H. Y., E. E. Giorgi, B. F. Keele, B. Gaschen, G. S. Athreya, J. F. Salazar-Gonzalez, K. T. Pham, P. A. Goepfert, J. M. Kilby, M. S. Saag, E. L. Delwart, M. P. Busch, B. H. Hahn, G. M. Shaw, B. T. Korber, T. Bhattacharya and A. S. Perelson (2009). "Modeling sequence evolution in acute HIV-1 infection." *J Theor Biol* **261**(2): 341-360.

Lefrere, J. J., L. Morand-Joubert, M. Mariotti, H. Bludau, B. Burghoffer, J. C. Petit and F. Roudot-Thoraval (1997). "Even individuals considered as long-term nonprogressors show biological signs of progression after 10 years of human immunodeficiency virus infection." *Blood* **90**(3): 1133-1140.

Lehmann-Che, J. and A. Saib (2004). "Early stages of HIV replication: how to hijack cellular functions for a successful infection." *AIDS Rev* **6**(4): 199-207.

Lemey, P., A. Rambaut and O. G. Pybus (2006). "HIV evolutionary dynamics within and among hosts." *AIDS Rev* **8**(3): 125-140.

Leng, Q., G. Borkow, Z. Weisman, M. Stein, A. Kalinkovich and Z. Bentwich (2001). "Immune activation correlates better than HIV plasma viral load with CD4 T-cell decline during HIV infection." *J Acquir Immune Defic Syndr* **27**(4): 389-397.

Leruez-Ville, M., E. Dulioust, D. Costabliola, D. Salmon, A. Tachet, L. Finkielsztejn, M. De Almeida, B. Silberman, D. Sicard, P. Jouannet and C. Rouzioux (2002). "Decrease in HIV-1 seminal shedding in men receiving highly active antiretroviral therapy: an 18 month longitudinal study (ANRS EP012)." *AIDS* **16**(3): 486-488.

Leshinsky-Silver, E., G. Malinger, L. Ben-Sira, D. Kidron, S. Cohen, S. Inbar, T. Bezaleli, A. Levine, C. Vinkler, D. Lev and T. Lerman-Sagie (2011). "A large homozygous deletion in the SAMHD1 gene causes atypical Aicardi-Goutieres syndrome associated with mtDNA deletions." *Eur J Hum Genet* **19**(3): 287-292.

Lewin, S. R., J. M. Murray, A. Solomon, F. Wightman, P. U. Cameron, D. J. Purcell, J. J. Zaunders, P. Grey, M. Bloch, D. Smith, D. A. Cooper and A. D. Kelleher (2008). "Virologic determinants of success after structured treatment interruptions of antiretrovirals in acute HIV-1 infection." *J Acquir Immune Defic Syndr* **47**(2): 140-147.

Lewin, S. R. and C. Rouzioux (2011). "HIV cure and eradication: how will we get from the laboratory to effective clinical trials?" *AIDS* **25**(7): 885-897.

Li, J. Z., B. Etemad, H. Ahmed, E. Aga, R. J. Bosch, J. W. Mellors, D. R. Kuritzkes, M. M. Lederman, M. Para and R. T. Gandhi (2016). "The size of the expressed HIV reservoir predicts timing of viral rebound after treatment interruption." *AIDS* **30**(3): 343-353.

Li, Y., J. Kong, X. Peng, W. Hou, X. Qin and X. F. Yu (2015). "Structural Insights into the High-efficiency Catalytic Mechanism of the Sterile alpha-Motif/Histidine-Aspartate Domain-containing Protein." *J Biol Chem* **290**(49): 29428-29437.

Lienlaf, M., F. Hayashi, F. Di Nunzio, N. Tochio, T. Kigawa, S. Yokoyama and F. Diaz-Griffero (2011). "Contribution of E3-ubiquitin ligase activity to HIV-1 restriction by TRIM5alpha(rh): structure of the RING domain of TRIM5alpha." *J Virol* **85**(17): 8725-8737.

Lifson, A. R., S. P. Buchbinder, H. W. Sheppard, A. C. Mawle, J. C. Wilber, M. Stanley, C. E. Hart, N. A. Hessol and S. D. Holmberg (1991). "Long-term human immunodeficiency virus infection in asymptomatic homosexual and bisexual men with normal CD4+ lymphocyte counts: immunologic and virologic characteristics." *J Infect Dis* **163**(5): 959-965.

Lindqvist, M., J. van Lunzen, D. Z. Soghoian, B. D. Kuhl, S. Ranasinghe, G. Kranias, M. D. Flanders, S. Cutler, N. Yudanin, M. I. Muller, I. Davis, D. Farber, P. Hartjen, F. Haag, G. Alter, J. Schulze zur Wiesch and H. Streeck (2012). "Expansion of HIV-specific T follicular helper cells in chronic HIV infection." *J Clin Invest* **122**(9): 3271-3280.

Liu, B., P. T. Sarkis, K. Luo, Y. Yu and X. F. Yu (2005). "Regulation of Apobec3F and human immunodeficiency virus type 1 Vif by Vif-Cul5-ElonB/C E3 ubiquitin ligase." *J Virol* **79**(15): 9579-9587.

Liu, Z., W. G. Cumberland, L. E. Hultin, H. E. Prince, R. Detels and J. V. Giorgi (1997). "Elevated CD38 antigen expression on CD8+ T cells is a stronger marker for the risk of chronic HIV disease progression to AIDS and death in the Multicenter AIDS Cohort Study than CD4+ cell count, soluble immune activation markers, or combinations of HLA-DR and CD38 expression." *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* **16**(2): 83-92.

Liuzzi, G., A. Chirianni, M. Zaccarelli, D. Zinzi, V. Esposito, V. Guadagnino, A. Antinori and M. Piazza (2004). "Differences between semen and plasma of nucleoside reverse transcriptase resistance mutations in HIV-infected patients, using a rapid assay." *In Vivo* **18**(4): 509-512.

Liuzzi, G., G. D'Offizi, S. Topino, M. Zaccarelli, A. Amendola, M. R. Capobianchi, C. F. Perno, P. Narciso and A. Antinori (2003). "Dynamics of viral load rebound in plasma and semen after stopping effective antiretroviral therapy." *AIDS* **17**(7): 1089-1092.

Loiseau, C., M. Requena, M. Mavigner, M. Cazabat, N. Carrere, B. Suc, K. Barange, L. Alric, B. Marchou, P. Massip, J. Izopet and P. Delobel (2016). "CCR6(-) regulatory T cells blunt the restoration of gut Th17 cells along the CCR6-CCL20 axis in treated HIV-1-infected individuals." *Mucosal Immunol* **9**(5): 1137-1150.

Lore, K., A. Smed-Sorensen, J. Vasudevan, J. R. Mascola and R. A. Koup (2005). "Myeloid and plasmacytoid dendritic cells transfer HIV-1 preferentially to antigen-specific CD4+ T cells." *J Exp Med* **201**(12): 2023-2033.

Lorenzi, J. C., Y. Z. Cohen, L. B. Cohn, E. F. Kreider, J. P. Barton, G. H. Learn, T. Oliveira, C. L. Lavine, J. A. Horwitz, A. Settler, M. Jankovic, M. S. Seaman, A. K. Chakraborty, B. H. Hahn, M. Caskey and M. C. Nussenzweig (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.

Lorenzo-Redondo, R., H. R. Fryer, T. Bedford, E. Y. Kim, J. Archer, S. L. K. Pond, Y. S. Chung, S. Penugonda, J. Chipman, C. V. Fletcher, T. W. Schacker, M. H. Malim, A. Rambaut, A. T. Haase, A. R. McLean and S. M. Wolinsky (2016). "Persistent HIV-1 replication maintains the tissue reservoir during therapy." *Nature* **530**(7588): 51-56.

Lubong Sabado, R., D. G. Kavanagh, D. E. Kaufmann, K. Fru, E. Babcock, E. Rosenberg, B. Walker, J. Lifson, N. Bhardwaj and M. Larsson (2009). "In vitro priming recapitulates in vivo HIV-1 specific T cell responses, revealing rapid loss of virus reactive CD4 T cells in acute HIV-1 infection." *PLoS One* **4**(1): e4256.

Luteijn, R., G. Sciaranghella, J. van Lunzen, A. Nolting, A. S. Dugast, M. S. Ghebremichael, M. Altfeld and G. Alter (2011). "Early viral replication in lymph nodes provides HIV with a means by which to escape NK-cell-mediated control." *Eur J Immunol* **41**(9): 2729-2740.

Ma, C. S., E. K. Deenick, M. Batten and S. G. Tangye (2012). "The origins, function, and regulation of T follicular helper cells." *J Exp Med* **209**(7): 1241-1253.

Madani, N. and D. Kabat (1998). "An endogenous inhibitor of human immunodeficiency virus in human lymphocytes is overcome by the viral Vif protein." *J Virol* **72**(12): 10251-10255.

Maldarelli, F., X. Wu, L. Su, F. R. Simonetti, W. Shao, S. Hill, J. Spindler, A. L. Ferris, J. W. Mellors, M. F. Kearney, J. M. Coffin and S. H. Hughes (2014). "HIV latency. Specific HIV integration sites are linked to clonal expansion and persistence of infected cells." *Science* **345**(6193): 179-183.

Mangeat, B., G. Gers-Huber, M. Lehmann, M. Zufferey, J. Luban and V. Piguet (2009). "HIV-1 Vpu neutralizes the antiviral factor Tetherin/BST-2 by binding it and directing its beta-TrCP2-dependent degradation." *PLoS Pathog* **5**(9): e1000574.

Mangeat, B., P. Turelli, G. Caron, M. Friedli, L. Perrin and D. Trono (2003). "Broad antiretroviral defence by human APOBEC3G through lethal editing of nascent reverse transcripts." *Nature* **424**(6944): 99-103.

Marban, C., F. Forouzanfar, A. Ait-Ammar, F. Fahmi, H. El Mekdad, F. Daouad, O. Rohr and C. Schwartz (2016). "Targeting the Brain Reservoirs: Toward an HIV Cure." *Front Immunol* **7**: 397.

Margolick, J. B., D. J. Volkman, T. M. Folks and A. S. Fauci (1987). "Amplification of HTLV-III/LAV infection by antigen-induced activation of T cells and direct suppression by virus of lymphocyte blastogenic responses." *J Immunol* **138**(6): 1719-1723.

Marini, B., A. Kertesz-Farkas, H. Ali, B. Lucic, K. Lisek, L. Manganaro, S. Pongor, R. Luzzati, A. Recchia, F. Mavilio, M. Giacca and M. Lusic (2015). "Nuclear architecture dictates HIV-1 integration site selection." *Nature* **521**(7551): 227-231.

Marras, D., L. A. Bruggeman, F. Gao, N. Tanji, M. M. Mansukhani, A. Cara, M. D. Ross, G. L. Gusella, G. Benson, V. D. D'Agati, B. H. Hahn, M. E. Klotman and P. E. Klotman (2002). "Replication and compartmentalization of HIV-1 in kidney epithelium of patients with HIV-associated nephropathy." *Nat Med* **8**(5): 522-526.

Massanella, M., R. Fromentin and N. Chomont (2016). "Residual inflammation and viral reservoirs: alliance against an HIV cure." *Curr Opin HIV AIDS* **11**(2): 234-241.

Mattapallil, J. J., D. C. Douek, B. Hill, Y. Nishimura, M. Martin and M. Roederer (2005). "Massive infection and loss of memory CD4+ T cells in multiple tissues during acute SIV infection." *Nature* **434**(7037): 1093-1097.

Mavigner, M., M. Cazabat, M. Dubois, F. E. L'Faqihi, M. Requena, C. Pasquier, P. Klopp, J. Amar, L. Alric, K. Barange, J. P. Vinel, B. Marchou, P. Massip, J. Izopet and P. Delobel (2012). "Altered CD4+ T cell homing to the gut impairs mucosal immune reconstitution in treated HIV-infected individuals." *J Clin Invest* **122**(1): 62-69.

Mayer, K. H., S. Boswell, R. Goldstein, W. Lo, C. Xu, L. Tucker, M. P. DePasquale, R. D'Aquila and D. J. Anderson (1999). "Persistence of human immunodeficiency virus in semen after adding indinavir to combination antiretroviral therapy." *Clin Infect Dis* **28**(6): 1252-1259.

McDougal, J. S., S. P. Cort, M. S. Kennedy, C. D. Cabridilla, P. M. Feorino, D. P. Francis, D. Hicks, V. S. Kalyanaraman and L. S. Martin (1985). "Immunoassay for the detection and quantitation of infectious human retrovirus, lymphadenopathy-associated virus (LAV)." *J Immunol Methods* **76**(1): 171-183.

McElrath, M. J., J. E. Pruetz and Z. A. Cohn (1989). "Mononuclear phagocytes of blood and bone marrow: comparative roles as viral reservoirs in human immunodeficiency virus type 1 infections." *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**(2): 675-679.

McHugh, R. S., M. J. Whitters, C. A. Piccirillo, D. A. Young, E. M. Shevach, M. Collins and M. C. Byrne (2002). "CD4(+)CD25(+) immunoregulatory T cells: gene expression analysis reveals a functional role for the glucocorticoid-induced TNF receptor." *Immunity* **16**(2): 311-323.

McKinnon, L. R., B. Nyanga, C. J. Kim, P. Izulla, J. Kwatampora, M. Kimani, K. Shahabi, N. Mugo, J. S. Smith, A. O. Anzala, J. Kimani and R. Kaul (2015). "Early HIV-1 infection is associated with reduced frequencies of cervical Th17 cells." *J Acquir Immune Defic Syndr* **68**(1): 6-12.

McMichael, A. J., P. Borrow, G. D. Tomaras, N. Goonetilleke and B. F. Haynes (2010). "The immune response during acute HIV-1 infection: clues for vaccine development." *Nat Rev Immunol* **10**(1): 11-23.

Mehandru, S., M. A. Poles, K. Tenner-Racz, P. Jean-Pierre, V. Manuelli, P. Lopez, A. Shet, A. Low, H. Mohri, D. Boden, P. Racz and M. Markowitz (2006). "Lack of mucosal immune reconstitution during prolonged treatment of acute and early HIV-1 infection." *PLoS Med* **3**(12): e484.

Meltzer, M. S., M. Nakamura, B. D. Hansen, J. A. Turpin, D. C. Kalter and H. E. Gendelman (1990). "Macrophages as susceptible targets for HIV infection, persistent viral reservoirs in tissue, and key immunoregulatory cells that control levels of virus replication and extent of disease." *AIDS Res Hum Retroviruses* **6**(8): 967-971.

Mexas, A. M., E. H. Graf, M. J. Pace, J. J. Yu, E. Papasavvas, L. Azzoni, M. P. Busch, M. Di Mascio, A. S. Foulkes, S. A. Migueles, L. J. Montaner and U. O'Doherty (2012). "Concurrent measures of total and integrated HIV DNA monitor reservoirs and ongoing replication in eradication trials." *AIDS* **26**(18): 2295-2306.

Miazzi, C., P. Ferraro, G. Pontarin, C. Rampazzo, P. Reichard and V. Bianchi (2014). "Allosteric regulation of the human and mouse deoxyribonucleotide triphosphohydrolase sterile alpha-motif/histidine-aspartate domain-containing protein 1 (SAMHD1)." *J Biol Chem* **289**(26): 18339-18346.

Micci, L., B. Cervasi, Z. S. Ende, R. I. Iriete, E. Reyes-Aviles, C. Vinton, J. Else, G. Silvestri, A. A. Ansari, F. Villinger, S. Pahwa, J. D. Estes, J. M. Brenchley and M. Paiardini (2012). "Paucity of IL-21-producing CD4(+) T cells is associated with Th17 cell depletion in SIV infection of rhesus macaques." *Blood* **120**(19): 3925-3935.

Michie, C. A., A. McLean, C. Alcock and P. C. Beverley (1992). "Lifespan of human lymphocyte subsets defined by CD45 isoforms." *Nature* **360**(6401): 264-265.

Miles, B. and E. Connick (2016). "TFH in HIV Latency and as Sources of Replication-Competent Virus." *Trends Microbiol* **24**(5): 338-344.

Mitchell, R. S., C. Katsura, M. A. Skasko, K. Fitzpatrick, D. Lau, A. Ruiz, E. B. Stephens, F. Margottin-Goguet, R. Benarous and J. C. Guatelli (2009). "Vpu antagonizes BST-2-mediated restriction of HIV-1 release via beta-TrCP and endo-lysosomal trafficking." *PLoS Pathog* **5**(5): e1000450.

Miyagi, E., A. J. Andrew, S. Kao and K. Strebel (2009). "Vpu enhances HIV-1 virus release in the absence of Bst-2 cell surface down-modulation and intracellular depletion." *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(8): 2868-2873.

Miyara, M., G. Gorochov, M. Ehrenstein, L. Musset, S. Sakaguchi and Z. Amoura (2011). "Human FoxP3+ regulatory T cells in systemic autoimmune diseases." *Autoimmun Rev* **10**(12): 744-755.

Moir, S., R. Lapointe, A. Malaspina, M. Ostrowski, C. E. Cole, T. W. Chun, J. Adelsberger, M. Baseler, P. Hwu and A. S. Fauci (1999). "CD40-Mediated induction of CD4 and CXCR4 on B lymphocytes correlates with restricted susceptibility to human immunodeficiency virus type 1 infection: potential role of B lymphocytes as a viral reservoir." *J Virol* **73**(10): 7972-7980.

Monteiro, P., A. Gosselin, V. S. Wacleche, M. El-Far, E. A. Said, H. Kared, N. Grandvaux, M. R. Boulassel, J. P. Routy and P. Ancuta (2011). "Memory CCR6+CD4+ T cells are preferential targets for productive HIV type 1 infection regardless of their expression of integrin beta7." *J Immunol* **186**(8): 4618-4630.

Morris, A., M. Marsden, K. Halcrow, E. S. Hughes, R. P. Brette, J. E. Bell and P. Simmonds (1999). "Mosaic structure of the human immunodeficiency virus type 1 genome

infecting lymphoid cells and the brain: evidence for frequent in vivo recombination events in the evolution of regional populations." *J Virol* **73**(10): 8720-8731.

Moukambi, F., H. Rabazanahary, V. Rodrigues, G. Racine, L. Robitaille, B. Krust, G. Andreani, C. Soundaramourty, R. Silvestre, M. Laforge and J. Estaquier (2015). "Early Loss of Splenic Tfh Cells in SIV-Infected Rhesus Macaques." *PLoS Pathog* **11**(12): e1005287.

Mowat, A. M. and J. L. Viney (1997). "The anatomical basis of intestinal immunity." *Immunol Rev* **156**: 145-166.

Munir, S., S. Thierry, F. Subra, E. Deprez and O. Delelis (2013). "Quantitative analysis of the time-course of viral DNA forms during the HIV-1 life cycle." *Retrovirology* **10**: 87.

Munoz, A., A. J. Kirby, Y. D. He, J. B. Margolick, B. R. Visscher, C. R. Rinaldo, R. A. Kaslow and J. P. Phair (1995). "Long-term survivors with HIV-1 infection: incubation period and longitudinal patterns of CD4+ lymphocytes." *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* **8**(5): 496-505.

Murray, A. J., K. J. Kwon, D. L. Farber and R. F. Siliciano (2016). "The Latent Reservoir for HIV-1: How Immunologic Memory and Clonal Expansion Contribute to HIV-1 Persistence." *J Immunol* **197**(2): 407-417.

Musumeci, D., C. Riccardi and D. Montesarchio (2015). "G-Quadruplex Forming Oligonucleotides as Anti-HIV Agents." *Molecules* **20**(9): 17511-17532.

Mzingwane, M. L. and C. T. Tiemessen (2017). "Mechanisms of HIV persistence in HIV reservoirs." *Rev Med Virol* **27**(2).

Najera, R., E. Delgado, L. Perez-Alvarez and M. M. Thomson (2002). "Genetic recombination and its role in the development of the HIV-1 pandemic." *AIDS* **16** **Suppl 4**: S3-16.

Neil, S. J., T. Zang and P. D. Bieniasz (2008). "Tetherin inhibits retrovirus release and is antagonized by HIV-1 Vpu." *Nature* **451**(7177): 425-430.

Nicholson, J. K., G. D. Cross, C. S. Callaway and J. S. McDougal (1986). "In vitro infection of human monocytes with human T lymphotropic virus type III/lymphadenopathy-associated virus (HTLV-III/LAV)." *J Immunol* **137**(1): 323-329.

North, T. W., J. Higgins, J. D. Deere, T. L. Hayes, A. Villalobos, L. Adamson, B. L. Shacklett, R. F. Schinazi and P. A. Luciw (2010). "Viral sanctuaries during highly active antiretroviral therapy in a nonhuman primate model for AIDS." *J Virol* **84**(6): 2913-2922.

Nunnari, G., M. Otero, G. Dornadula, M. Vanella, H. Zhang, I. Frank and R. J. Pomerantz (2002). "Residual HIV-1 disease in seminal cells of HIV-1-infected men on suppressive HAART: latency without on-going cellular infections." *AIDS* **16**(1): 39-45.

O'Brien, T. R., W. A. Blattner, D. Waters, E. Eyster, M. W. Hilgartner, A. R. Cohen, N. Luban, A. Hatzakis, L. M. Aledort, P. S. Rosenberg, W. J. Miley, B. L. Kroner and J. J. Goedert (1996). "Serum HIV-1 RNA levels and time to development of AIDS in the Multicenter Hemophilia Cohort Study." *JAMA* **276**(2): 105-110.

O'Brien, W. A. (1994). "HIV-1 entry and reverse transcription in macrophages." *J Leukoc Biol* **56**(3): 273-277.

Okoye, A. A. and L. J. Picker (2013). "CD4(+) T-cell depletion in HIV infection: mechanisms of immunological failure." *Immunol Rev* **254**(1): 54-64.

Oliveira, M. F., A. Chaillon, M. Nakazawa, M. Vargas, S. L. Letendre, M. C. Strain, R. J. Ellis, S. Morris, S. J. Little, D. M. Smith and S. Gianella (2017). "Early Antiretroviral Therapy Is Associated with Lower HIV DNA Molecular Diversity and Lower Inflammation in Cerebrospinal Fluid but Does Not Prevent the Establishment of Compartmentalized HIV DNA Populations." *PLoS Pathog* **13**(1): e1006112.

Orenstein, J. M., C. Fox and S. M. Wahl (1997). "Macrophages as a source of HIV during opportunistic infections." *Science* **276**(5320): 1857-1861.

Oxenius, A., S. Fidler, M. Brady, S. J. Dawson, K. Ruth, P. J. Easterbrook, J. N. Weber, R. E. Phillips and D. A. Price (2001). "Variable fate of virus-specific CD4(+) T cells during primary HIV-1 infection." *Eur J Immunol* **31**(12): 3782-3788.

Palella, F. J., Jr., K. M. Delaney, A. C. Moorman, M. O. Loveless, J. Fuhrer, G. A. Satten, D. J. Aschman and S. D. Holmberg (1998). "Declining morbidity and mortality among patients with advanced human immunodeficiency virus infection. HIV Outpatient Study Investigators." *N Engl J Med* **338**(13): 853-860.

Pallikkuth, S., M. Sharkey, D. Z. Babic, S. Gupta, G. W. Stone, M. A. Fischl, M. Stevenson and S. Pahwa (2015). "Peripheral T Follicular Helper Cells Are the Major HIV Reservoir within Central Memory CD4 T Cells in Peripheral Blood from Chronically HIV-Infected Individuals on Combination Antiretroviral Therapy." *J Virol* **90**(6): 2718-2728.

Palmer, B. E., N. Blyveis, A. P. Fontenot and C. C. Wilson (2005). "Functional and phenotypic characterization of CD57+CD4+ T cells and their association with HIV-1-induced T cell dysfunction." *J Immunol* **175**(12): 8415-8423.

Palmer, B. E., E. Boritz and C. C. Wilson (2004). "Effects of sustained HIV-1 plasma viremia on HIV-1 Gag-specific CD4+ T cell maturation and function." *J Immunol* **172**(5): 3337-3347.

Palmer, S., F. Maldarelli, A. Wiegand, B. Bernstein, G. J. Hanna, S. C. Brun, D. J. Kempf, J. W. Mellors, J. M. Coffin and M. S. King (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.

Pan, X., H. M. Baldauf, O. T. Keppler and O. T. Fackler (2013). "Restrictions to HIV-1 replication in resting CD4+ T lymphocytes." *Cell Res* **23**(7): 876-885.

Pantaleo, G., J. F. Demarest, H. Soudeyns, C. Graziosi, F. Denis, J. W. Adelsberger, P. Borrow, M. S. Saag, G. M. Shaw, R. P. Sekaly and et al. (1994). "Major expansion of CD8+ T cells with a predominant V beta usage during the primary immune response to HIV." *Nature* **370**(6489): 463-467.

Pantaleo, G., C. Graziosi, J. F. Demarest, L. Butini, M. Montroni, C. H. Fox, J. M. Orenstein, D. P. Kotler and A. S. Fauci (1993). "HIV infection is active and progressive in lymphoid tissue during the clinically latent stage of disease." *Nature* **362**(6418): 355-358.

Pantaleo, G., C. Graziosi and A. S. Fauci (1993). "The role of lymphoid organs in the pathogenesis of HIV infection." *Semin Immunol* **5**(3): 157-163.

Pantaleo, G., S. Menzo, M. Vaccarezza, C. Graziosi, O. J. Cohen, J. F. Demarest, D. Montefiori, J. M. Orenstein, C. Fox, L. K. Schrager and et al. (1995). "Studies in subjects with long-term nonprogressive human immunodeficiency virus infection." *N Engl J Med* **332**(4): 209-216.

Papagno, L., C. A. Spina, A. Marchant, M. Salio, N. Rufer, S. Little, T. Dong, G. Chesney, A. Waters, P. Easterbrook, P. R. Dunbar, D. Shepherd, V. Cerundolo, V. Emery, P. Griffiths, C. Conlon, A. J. McMichael, D. D. Richman, S. L. Rowland-Jones and V. Appay (2004). "Immune activation and CD8+ T-cell differentiation towards senescence in HIV-1 infection." *PLoS Biol* **2**(2): E20.

Park, H., Z. Li, X. O. Yang, S. H. Chang, R. Nurieva, Y. H. Wang, Y. Wang, L. Hood, Z. Zhu, Q. Tian and C. Dong (2005). "A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17." *Nat Immunol* **6**(11): 1133-1141.

Pasternak, A. O., L. K. DeMaster, N. A. Kootstra, P. Reiss, U. O'Doherty and B. Berkhout (2016). "Minor Contribution of Chimeric Host-HIV Readthrough Transcripts to the Level of HIV Cell-Associated gag RNA." *J Virol* **90**(2): 1148-1151.

Pasternak, A. O., S. Jurriaans, M. Bakker, J. M. Prins, B. Berkhout and V. V. Lukashov (2009). "Cellular levels of HIV unspliced RNA from patients on combination antiretroviral therapy with undetectable plasma viremia predict the therapy outcome." *PLoS One* **4**(12): e8490.

Patel, S. S., A. D. Duby, D. L. Thiele and P. E. Lipsky (1988). "Phenotypic and functional characterization of human T cell clones." *J Immunol* **141**(11): 3726-3736.

Pauls, E., E. Jimenez, A. Ruiz, M. Permanyer, E. Ballana, H. Costa, R. Nascimiento, R. M. Parkhouse, R. Pena, E. Riveiro-Munoz, M. A. Martinez, B. Clotet, J. A. Este and M. Bofill (2013). "Restriction of HIV-1 replication in primary macrophages by IL-12 and IL-18 through the upregulation of SAMHD1." *J Immunol* **190**(9): 4736-4741.

Pauls, E., A. Ruiz, R. Badia, M. Permanyer, A. Gubern, E. Riveira-Munoz, J. Torres-Torronteras, M. Alvarez, B. Mothe, C. Brander, M. Crespo, L. Menendez-Arias, B. Clotet, O. T. Keppler, R. Marti, F. Posas, E. Ballana and J. A. Este (2014). "Cell cycle control and HIV-1 susceptibility are linked by CDK6-dependent CDK2 phosphorylation of SAMHD1 in myeloid and lymphoid cells." *J Immunol* **193**(4): 1988-1997.

Pauls, E., A. Ruiz, E. Riveira-Munoz, M. Permanyer, R. Badia, B. Clotet, O. T. Keppler, E. Ballana and J. A. Este (2014). "p21 regulates the HIV-1 restriction factor SAMHD1." *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**(14): E1322-1324.

Paulsen, M. and O. Janssen (2011). "Pro- and anti-apoptotic CD95 signaling in T cells." *Cell Commun Signal* **9**: 7.

Pepin, J. (2013). "The origins of AIDS: from patient zero to ground zero." *J Epidemiol Community Health* **67**(6): 473-475.

Perelson, A. S., P. Essunger, Y. Cao, M. Vesanen, A. Hurley, K. Saksela, M. Markowitz and D. D. Ho (1997). "Decay characteristics of HIV-1-infected compartments during combination therapy." *Nature* **387**(6629): 188-191.

Perelson, A. S., A. U. Neumann, M. Markowitz, J. M. Leonard and D. D. Ho (1996). "HIV-1 dynamics in vivo: virion clearance rate, infected cell life-span, and viral generation time." *Science* **271**(5255): 1582-1586.

Peretz, Y., Z. He, Y. Shi, B. Yassine-Diab, J. P. Goulet, R. Bordi, A. Filali-Mouhim, J. B. Loubert, M. El-Far, F. P. Dupuy, M. R. Boulassel, C. Tremblay, J. P. Routy, N. Bernard, R. Balderas, E. K. Haddad and R. P. Sekaly (2012). "CD160 and PD-1 co-expression on HIV-specific CD8 T cells defines a subset with advanced dysfunction." *PLoS Pathog* **8**(8): e1002840.

Pereyra, F., M. M. Addo, D. E. Kaufmann, Y. Liu, T. Miura, A. Rathod, B. Baker, A. Trocha, R. Rosenberg, E. Mackey, P. Ueda, Z. Lu, D. Cohen, T. Wrin, C. J. Petropoulos, E. S. Rosenberg and B. D. Walker (2008). "Genetic and immunologic heterogeneity among persons who control HIV infection in the absence of therapy." *J Infect Dis* **197**(4): 563-571.

Perez-Caballero, D., T. Zang, A. Ebrahimi, M. W. McNatt, D. A. Gregory, M. C. Johnson and P. D. Bieniasz (2009). "Tetherin inhibits HIV-1 release by directly tethering virions to cells." *Cell* **139**(3): 499-511.

Perno, C. F., F. M. Newcomb, D. A. Davis, S. Aquaro, R. W. Humphrey, R. Calio and R. Yarchoan (1998). "Relative potency of protease inhibitors in monocytes/macrophages acutely and chronically infected with human immunodeficiency virus." *J Infect Dis* **178**(2): 413-422.

Perreau, M., A. L. Savoye, E. De Crignis, J. M. Corpataux, R. Cubas, E. K. Haddad, L. De Leval, C. Graziosi and G. Pantaleo (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.

Persaud, D., H. Gay, C. Ziemniak, Y. H. Chen, M. Piatak, Jr., T. W. Chun, M. Strain, D. Richman and K. Luzuriaga (2013). "Absence of detectable HIV-1 viremia after treatment cessation in an infant." *N Engl J Med* **369**(19): 1828-1835.

Persaud, D., Y. Zhou, J. M. Siliciano and R. F. Siliciano (2003). "Latency in human immunodeficiency virus type 1 infection: no easy answers." *J Virol* **77**(3): 1659-1665.

Pertel, T., S. Hausmann, D. Morger, S. Zuger, J. Guerra, J. Lascano, C. Reinhard, F. A. Santoni, P. D. Uchil, L. Chatel, A. Bisiaux, M. L. Albert, C. Strambio-De-Castillia, W. Mothes, M. Pizzato, M. G. Grutter and J. Luban (2011). "TRIM5 is an innate immune sensor for the retrovirus capsid lattice." *Nature* **472**(7343): 361-365.

Petrovas, C., T. Yamamoto, M. Y. Gerner, K. L. Boswell, K. Wloka, E. C. Smith, D. R. Ambrozak, N. G. Sandler, K. J. Timmer, X. Sun, L. Pan, A. Poholek, S. S. Rao, J. M. Brenchley, S. M. Alam, G. D. Tomaras, M. Roederer, D. C. Douek, R. A. Seder, R. N. Germain, E. K. Haddad and R. A. Koup (2012). "CD4 T follicular helper cell dynamics during SIV infection." *J Clin Invest* **122**(9): 3281-3294.

Pillai, S. K., B. Good, S. K. Pond, J. K. Wong, M. C. Strain, D. D. Richman and D. M. Smith (2005). "Semen-specific genetic characteristics of human immunodeficiency virus type 1 env." *J Virol* **79**(3): 1734-1742.

Pillai, S. K., S. L. Pond, Y. Liu, B. M. Good, M. C. Strain, R. J. Ellis, S. Letendre, D. M. Smith, H. F. Gunthard, I. Grant, T. D. Marcotte, J. A. McCutchan, D. D. Richman and J. K. Wong (2006). "Genetic attributes of cerebrospinal fluid-derived HIV-1 env." *Brain* **129**(Pt 7): 1872-1883.

Pinkevych, M., D. Cromer, M. Tolstrup, A. J. Grimm, D. A. Cooper, S. R. Lewin, O. S. Sogaard, T. A. Rasmussen, S. J. Kent, A. D. Kelleher and M. P. Davenport (2015). "HIV Reactivation from Latency after Treatment Interruption Occurs on Average Every 5-8 Days--Implications for HIV Remission." *PLoS Pathog* **11**(7): e1005000.

Planas, D., Y. Zhang, P. Monteiro, J. P. Goulet, A. Gosselin, N. Grandvaux, T. J. Hope, A. Fassati, J. P. Routy and P. Ancuta (2017). "HIV-1 selectively targets gut-homing CCR6+CD4+ T cells via mTOR-dependent mechanisms." *JCI Insight* **2**(15).

Pollack, R. A., R. B. Jones, M. Perteau, K. M. Bruner, A. R. Martin, A. S. Thomas, A. A. Capoferri, S. A. Beg, S. H. Huang, S. Karandish, H. Hao, E. Halper-Stromberg, P. C. Yong, C. Kovacs, E. Benko, R. F. Siliciano and Y. C. Ho (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.

Pombo, C., E. J. Wherry, E. Gostick, D. A. Price and M. R. Betts (2015). "Elevated Expression of CD160 and 2B4 Defines a Cytolytic HIV-Specific CD8+ T-Cell Population in Elite Controllers." *J Infect Dis* **212**(9): 1376-1386.

Poonia, B., C. D. Pauza and M. S. Salvato (2009). "Role of the Fas/FasL pathway in HIV or SIV disease." *Retrovirology* **6**: 91.

Popov, S., A. L. Chenine, A. Gruber, P. L. Li and R. M. Ruprecht (2005). "Long-term productive human immunodeficiency virus infection of CD1a-sorted myeloid dendritic cells." *J Virol* **79**(1): 602-608.

Potter, S. J., P. Lemey, G. Achaz, C. B. Chew, A. M. Vandamme, D. E. Dwyer and N. K. Saksena (2004). "HIV-1 compartmentalization in diverse leukocyte populations during antiretroviral therapy." *J Leukoc Biol* **76**(3): 562-570.

Powell, R. D., P. J. Holland, T. Hollis and F. W. Perrino (2011). "Aicardi-Goutieres syndrome gene and HIV-1 restriction factor SAMHD1 is a dGTP-regulated deoxynucleotide triphosphohydrolase." *J Biol Chem* **286**(51): 43596-43600.

Price, D. A., P. J. Goulder, P. Klenerman, A. K. Sewell, P. J. Easterbrook, M. Troop, C. R. Bangham and R. E. Phillips (1997). "Positive selection of HIV-1 cytotoxic T lymphocyte escape variants during primary infection." *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(5): 1890-1895.

Price, R. W. (2000). "The two faces of HIV infection of cerebrospinal fluid." *Trends Microbiol* **8**(9): 387-391.

Quayle, A. J., C. Xu, K. H. Mayer and D. J. Anderson (1997). "T lymphocytes and macrophages, but not motile spermatozoa, are a significant source of human immunodeficiency virus in semen." *J Infect Dis* **176**(4): 960-968.

Rallon, N., M. Garcia, J. Garcia-Samaniego, A. Cabello, B. Alvarez, C. Restrepo, S. Nistal, M. Gorgolas and J. M. Benito (2018). "Expression of PD-1 and Tim-3 markers of T-cell exhaustion is associated with CD4 dynamics during the course of untreated and treated HIV infection." *PLoS One* **13**(3): e0193829.

Ramesh, V., B. Bernardi, A. Stafa, C. Garone, E. Franzoni, M. Abinun, P. Mitchell, D. Mitra, M. Friswell, J. Nelson, S. A. Shalev, G. I. Rice, H. Gornall, M. Szykiewicz, F. Aymard, V. Ganesan, J. Prendiville, J. H. Livingston and Y. J. Crow (2010). "Intracerebral large artery disease in Aicardi-Goutieres syndrome implicates SAMHD1 in vascular homeostasis." *Dev Med Child Neurol* **52**(8): 725-732.

Ravenscroft, J. C., M. Suri, G. I. Rice, M. Szykiewicz and Y. J. Crow (2011). "Autosomal dominant inheritance of a heterozygous mutation in SAMHD1 causing familial chilblain lupus." *Am J Med Genet A* **155A**(1): 235-237.

Read, S., V. Malmstrom and F. Powrie (2000). "Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 plays an essential role in the function of CD25(+)CD4(+) regulatory cells that control intestinal inflammation." *J Exp Med* **192**(2): 295-302.

Reiss, Y., A. E. Proudfoot, C. A. Power, J. J. Campbell and E. C. Butcher (2001). "CC chemokine receptor (CCR)4 and the CCR10 ligand cutaneous T cell-attracting chemokine (CTACK) in lymphocyte trafficking to inflamed skin." *J Exp Med* **194**(10): 1541-1547.

Ribeiro Dos Santos, P., M. Rancez, J. L. Pretet, A. Michel-Salzat, V. Messent, A. Bogdanova, A. Couedel-Courteille, E. Souil, R. Cheynier and C. Butor (2011). "Rapid dissemination of SIV follows multisite entry after rectal inoculation." *PLoS One* **6**(5): e19493.

Rice, G. I., J. Bond, A. Asipu, R. L. Brunette, I. W. Manfield, I. M. Carr, J. C. Fuller, R. M. Jackson, T. Lamb, T. A. Briggs, M. Ali, H. Gornall, L. R. Couthard, A. Aeby, S. P. Attard-Montalto, E. Bertini, C. Bodemer, K. Brockmann, L. A. Brueton, P. C. Corry, I. Desguerre, E. Fazzi, A. G. Cazorla, B. Gener, B. C. Hamel, A. Heiberg, M. Hunter, M. S. van der Knaap, R. Kumar, L. Lagae, P. G. Landrieu, C. M. Lourenco, D. Marom, M. F. McDermott, W. van der Merwe, S. Orcesi, J. S. Prendiville, M. Rasmussen, S. A. Shalev, D. M. Soler, M. Shinawi, R. Spiegel, T. Y. Tan, A. Vanderver, E. L. Wakeling, E. Wassmer, E. Whittaker, P. Lebon, D. B. Stetson, D. T. Bonthron and Y. J. Crow (2009). "Mutations involved in Aicardi-Goutieres syndrome implicate SAMHD1 as regulator of the innate immune response." *Nat Genet* **41**(7): 829-832.

Richman, D. D., D. M. Margolis, M. Delaney, W. C. Greene, D. Hazuda and R. J. Pomerantz (2009). "The challenge of finding a cure for HIV infection." *Science* **323**(5919): 1304-1307.

Rivino, L., M. Messi, D. Jarrossay, A. Lanzavecchia, F. Sallusto and J. Geginat (2004). "Chemokine receptor expression identifies Pre-T helper (Th)1, Pre-Th2, and nonpolarized cells among human CD4+ central memory T cells." *J Exp Med* **200**(6): 725-735.

Robinson, H. L. (2002). "New hope for an AIDS vaccine." *Nat Rev Immunol* **2**(4): 239-250.

Rocha, B., N. Dautigny and P. Pereira (1989). "Peripheral T lymphocytes: expansion potential and homeostatic regulation of pool sizes and CD4/CD8 ratios in vivo." *Eur J Immunol* **19**(5): 905-911.

Rodes, B., C. Toro, E. Paxinos, E. Poveda, M. Martinez-Padial, J. M. Benito, V. Jimenez, T. Wrin, S. Bassani and V. Soriano (2004). "Differences in disease progression in a cohort of long-term non-progressors after more than 16 years of HIV-1 infection." *AIDS* **18**(8): 1109-1116.

Rose, R., S. L. Lamers, D. J. Nolan, E. Maidji, N. R. Faria, O. G. Pybus, J. J. Dollar, S. A. Maruniak, A. C. McAvoy, M. Salemi, C. A. Stoddart, E. J. Singer and M. S. McGrath (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.

Rosenberg, E. S., J. M. Billingsley, A. M. Caliendo, S. L. Boswell, P. E. Sax, S. A. Kalams and B. D. Walker (1997). "Vigorous HIV-1-specific CD4+ T cell responses associated with control of viremia." *Science* **278**(5342): 1447-1450.

Rosenbloom, D. I., O. Elliott, A. L. Hill, T. J. Henrich, J. M. Siliciano and R. F. Siliciano (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.

Rothenberger, M. K., B. F. Keele, S. W. Wietgreffe, C. V. Fletcher, G. J. Beilman, J. G. Chipman, A. Khoruts, J. D. Estes, J. Anderson, S. P. Callisto, T. E. Schmidt, A. Thorkelson, C. Reilly, K. Perkey, T. G. Reimann, N. S. Uday, K. Nganou Makamdop, M. Stevenson, D. C. Douek, A. T. Haase and T. W. Schacker (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.

Rouzioux, C. and D. Richman (2013). "How to best measure HIV reservoirs?" *Curr Opin HIV AIDS* **8**(3): 170-175.

Rowland-Jones, S. L. (2003). "Timeline: AIDS pathogenesis: what have two decades of HIV research taught us?" *Nat Rev Immunol* **3**(4): 343-348.

Rudensky, A. Y. (2011). "Regulatory T cells and Foxp3." *Immunol Rev* **241**(1): 260-268.

Ruelas, D. S. and W. C. Greene (2013). "An integrated overview of HIV-1 latency." *Cell* **155**(3): 519-529.

Ruffin, N., V. Brezar, D. Ayinde, C. Lefebvre, J. Schulze Zur Wiesch, J. van Lunzen, M. Bockhorn, O. Schwartz, H. Hocini, J. D. Lelievre, J. Banchereau, Y. Levy and N. Seddiki (2015). "Low SAMHD1 expression following T-cell activation and proliferation renders CD4+ T cells susceptible to HIV-1." *AIDS* **29**(5): 519-530.

Russell, R. A., N. Martin, I. Mitar, E. Jones and Q. J. Sattentau (2013). "Multiple proviral integration events after virological synapse-mediated HIV-1 spread." *Virology* **443**(1): 143-149.

Ryoo, J., J. Choi, C. Oh, S. Kim, M. Seo, S. Y. Kim, D. Seo, J. Kim, T. E. White, A. Brandariz-Nunez, F. Diaz-Griffero, C. H. Yun, J. A. Hollenbaugh, B. Kim, D. Baek and K. Ahn (2014). "The ribonuclease activity of SAMHD1 is required for HIV-1 restriction." *Nat Med* **20**(8): 936-941.

Saez-Cirion, A., C. Bacchus, L. Hocqueloux, V. Avettand-Fenoel, I. Girault, C. Lecuroux, V. Potard, P. Versmisse, A. Melard, T. Prazuck, B. Descours, J. Guernon, J. P. Viard, F. Boufassa, O. Lambotte, C. Goujard, L. Meyer, D. Costagliola, A. Venet, G. Pancino, B. Autran, C. Rouzioux and A. V. S. Group (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.

Sahu, G. K., D. Paar, S. D. Frost, M. M. Smith, S. Weaver and M. W. Cloyd (2009). "Low-level plasma HIVs in patients on prolonged suppressive highly active antiretroviral therapy are produced mostly by cells other than CD4 T-cells." *J Med Virol* **81**(1): 9-15.

Sakaguchi, S. (2004). "Naturally arising CD4+ regulatory t cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses." *Annu Rev Immunol* **22**: 531-562.

Sakaguchi, S., M. Miyara, C. M. Costantino and D. A. Hafler (2010). "FOXP3+ regulatory T cells in the human immune system." *Nat Rev Immunol* **10**(7): 490-500.

Sallusto, F. (2016). "Heterogeneity of Human CD4(+) T Cells Against Microbes." *Annu Rev Immunol* **34**: 317-334.

Sallusto, F., D. Impellizzieri, C. Basso, A. Laroni, A. Uccelli, A. Lanzavecchia and B. Engelhardt (2012). "T-cell trafficking in the central nervous system." *Immunol Rev* **248**(1): 216-227.

Sallusto, F., D. Lenig, R. Forster, M. Lipp and A. Lanzavecchia (1999). "Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions." *Nature* **401**(6754): 708-712.

Sandler, N. G. and D. C. Douek (2012). "Microbial translocation in HIV infection: causes, consequences and treatment opportunities." *Nat Rev Microbiol* **10**(9): 655-666.

Santiago, M. L., F. Range, B. F. Keele, Y. Li, E. Bailes, F. Bibollet-Ruche, C. Fruteau, R. Noe, M. Peeters, J. F. Brookfield, G. M. Shaw, P. M. Sharp and B. H. Hahn (2005). "Simian immunodeficiency virus infection in free-ranging sooty mangabeys (*Cercocebus atys atys*) from the Tai Forest, Cote d'Ivoire: implications for the origin of epidemic human immunodeficiency virus type 2." *J Virol* **79**(19): 12515-12527.

Sarmati, L., S. G. Parisi, M. Montano, S. Andreis, R. Scaggiante, A. Galgani, M. Viscione, G. Maffongelli, A. Ricciardi, C. Andreoni, S. Boros, G. Palu and M. Andreoni (2012). "Nevirapine use, prolonged antiretroviral therapy and high CD4 nadir values are strongly correlated with undetectable HIV-DNA and -RNA levels and CD4 cell gain." *J Antimicrob Chemother* **67**(12): 2932-2938.

Sauter, D., M. Schindler, A. Specht, W. N. Landford, J. Munch, K. A. Kim, J. Votteler, U. Schubert, F. Bibollet-Ruche, B. F. Keele, J. Takehisa, Y. Ogando, C. Ochsenbauer, J. C. Kappes, A. Ayoub, M. Peeters, G. H. Learn, G. Shaw, P. M. Sharp, P. Bieniasz, B. H. Hahn, T. Hatziioannou and F. Kirchhoff (2009). "Tetherin-driven adaptation of Vpu and Nef function and the evolution of pandemic and nonpandemic HIV-1 strains." *Cell Host Microbe* **6**(5): 409-421.

Sauter, D., A. Specht and F. Kirchhoff (2010). "Tetherin: holding on and letting go." *Cell* **141**(3): 392-398.

Sayah, D. M., E. Sokolskaja, L. Berthoux and J. Luban (2004). "Cyclophilin A retrotransposition into TRIM5 explains owl monkey resistance to HIV-1." *Nature* **430**(6999): 569-573.

Scarlata, S. and C. Carter (2003). "Role of HIV-1 Gag domains in viral assembly." *Biochim Biophys Acta* **1614**(1): 62-72.

Schmid, A., S. Gianella, V. von Wyl, K. J. Metzner, A. U. Scherrer, B. Niederost, C. F. Althaus, P. Rieder, C. Grube, B. Joos, R. Weber, M. Fischer and H. F. Gunthard (2010). "Profound depletion of HIV-1 transcription in patients initiating antiretroviral therapy during acute infection." *PLoS One* **5**(10): e13310.

Schmieder, R. and R. Edwards (2011). "Quality control and preprocessing of metagenomic datasets." *Bioinformatics* **27**(6): 863-864.

Schnittman, S. M., H. C. Lane, J. Greenhouse, J. S. Justement, M. Baseler and A. S. Fauci (1990). "Preferential infection of CD4+ memory T cells by human immunodeficiency

virus type 1: evidence for a role in the selective T-cell functional defects observed in infected individuals." *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**(16): 6058-6062.

Schuetz, A., C. Deleage, I. Sereti, R. Rerknimitr, N. Phanuphak, Y. Phuang-Ngern, J. D. Estes, N. G. Sandler, S. Sukhumvittaya, M. Marovich, S. Jongrakthaitae, S. Akapirat, J. L. Fletscher, E. Kroon, R. Dewar, R. Trichavaroj, N. Chomchey, D. C. Douek, O. C. RJ, V. Ngauy, M. L. Robb, P. Phanuphak, N. L. Michael, J. L. Excler, J. H. Kim, M. S. de Souza, J. Ananworanich, Rv254/Search and R. S. S. Groups (2014). "Initiation of ART during early acute HIV infection preserves mucosal Th17 function and reverses HIV-related immune activation." *PLoS Pathog* **10**(12): e1004543.

Seddiki, N., B. Santner-Nanan, J. Martinson, J. Zaunders, S. Sasson, A. Landay, M. Solomon, W. Selby, S. I. Alexander, R. Nanan, A. Kelleher and B. Fazekas de St Groth (2006). "Expression of interleukin (IL)-2 and IL-7 receptors discriminates between human regulatory and activated T cells." *J Exp Med* **203**(7): 1693-1700.

Sedgwick, J. D., A. L. Ford, E. Foulcher and R. Airriess (1998). "Central nervous system microglial cell activation and proliferation follows direct interaction with tissue-infiltrating T cell blasts." *J Immunol* **160**(11): 5320-5330.

Seu, L., S. Sabbaj, A. Duverger, F. Wagner, J. C. Anderson, E. Davies, F. Wolschendorf, C. D. Willey, M. S. Saag, P. Goepfert and O. Kutsch (2015). "Stable Phenotypic Changes of the Host T Cells Are Essential to the Long-Term Stability of Latent HIV-1 Infection." *J Virol* **89**(13): 6656-6672.

Shao, W., V. F. Boltz, J. E. Spindler, M. F. Kearney, F. Maldarelli, J. W. Mellors, C. Stewart, N. Volfovsky, A. Levitsky, R. M. Stephens and J. M. Coffin (2013). "Analysis of 454 sequencing error rate, error sources, and artifact recombination for detection of Low-frequency drug resistance mutations in HIV-1 DNA." *Retrovirology* **10**: 18.

Shapshak, P., D. M. Segal, K. A. Crandall, R. K. Fujimura, B. T. Zhang, K. Q. Xin, K. Okuda, C. K. Petit, C. Eisdorfer and K. Goodkin (1999). "Independent evolution of HIV type 1 in different brain regions." *AIDS Res Hum Retroviruses* **15**(9): 811-820.

Sharkey, M., D. Z. Babic, T. Greenough, R. Gulick, D. R. Kuritzkes and M. Stevenson (2011). "Episomal viral cDNAs identify a reservoir that fuels viral rebound after treatment interruption and that contributes to treatment failure." *PLoS Pathog* **7**(2): e1001303.

Sharkey, M. E., I. Teo, T. Greenough, N. Sharova, K. Luzuriaga, J. L. Sullivan, R. P. Bucy, L. G. Kostrikis, A. Haase, C. Veryard, R. E. Davaro, S. H. Cheeseman, J. S. Daly, C. Bova, R. T. Ellison, 3rd, B. Mady, K. K. Lai, G. Moyle, M. Nelson, B. Gazzard, S. Shaunak and M. Stevenson (2000). "Persistence of episomal HIV-1 infection intermediates in patients on highly active anti-retroviral therapy." *Nat Med* **6**(1): 76-81.

Sharova, N., C. Swingler, M. Sharkey and M. Stevenson (2005). "Macrophages archive HIV-1 virions for dissemination in trans." *EMBO J* **24**(13): 2481-2489.

Sharova, N., Y. Wu, X. Zhu, R. Stranska, R. Kaushik, M. Sharkey and M. Stevenson (2008). "Primate lentiviral Vpx commandeers DDB1 to counteract a macrophage restriction." *PLoS Pathog* **4**(5): e1000057.

Sharp, P. M., E. Bailes, R. R. Chaudhuri, C. M. Rodenburg, M. O. Santiago and B. H. Hahn (2001). "The origins of acquired immune deficiency syndrome viruses: where and when?" *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **356**(1410): 867-876.

Sharp, P. M. and B. H. Hahn (2011). "Origins of HIV and the AIDS pandemic." *Cold Spring Harb Perspect Med* **1**(1): a006841.

Shaw, G. M. and E. Hunter (2012). "HIV transmission." *Cold Spring Harb Perspect Med* **2**(11).

Sheehy, A. M., N. C. Gaddis, J. D. Choi and M. H. Malim (2002). "Isolation of a human gene that inhibits HIV-1 infection and is suppressed by the viral Vif protein." *Nature* **418**(6898): 646-650.

Shen, R., H. E. Richter, R. H. Clements, L. Novak, K. Huff, D. Bimczok, S. Sankaran-Walters, S. Dandekar, P. R. Clapham, L. E. Smythies and P. D. Smith (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.

Sheppard, H. W., W. Lang, M. S. Ascher, E. Vittinghoff and W. Winkelstein (1993). "The characterization of non-progressors: long-term HIV-1 infection with stable CD4+ T-cell levels." *AIDS* **7**(9): 1159-1166.

Sheth, P. M., D. Chege, L. Y. Shin, S. Huibner, F. Y. Yue, M. Loutfy, R. Halpenny, D. Persad, C. Kovacs, T. W. Chun, G. Kandel, M. Ostrowski and R. Kaul (2008). "Immune reconstitution in the sigmoid colon after long-term HIV therapy." *Mucosal Immunol* **1**(5): 382-388.

Shrikant, P. and E. N. Benveniste (1996). "The central nervous system as an immunocompetent organ: role of glial cells in antigen presentation." *J Immunol* **157**(5): 1819-1822.

Si-Mohamed, A., M. D. Kazatchkine, I. Heard, C. Goujon, T. Prazuck, G. Aymard, G. Cessot, Y. H. Kuo, M. C. Bernard, B. Diquet, J. E. Malkin, L. Gutmann and L. Belec (2000). "Selection of drug-resistant variants in the female genital tract of human immunodeficiency virus type 1-infected women receiving antiretroviral therapy." *J Infect Dis* **182**(1): 112-122.

Sigal, A. and D. Baltimore (2012). "As good as it gets? The problem of HIV persistence despite antiretroviral drugs." *Cell Host Microbe* **12**(2): 132-138.

Sigal, A., J. T. Kim, A. B. Balazs, E. Dekel, A. Mayo, R. Milo and D. Baltimore (2011). "Cell-to-cell spread of HIV permits ongoing replication despite antiretroviral therapy." *Nature* **477**(7362): 95-98.

Siliciano, J. D., J. Kajdas, D. Finzi, T. C. Quinn, K. Chadwick, J. B. Margolick, C. Kovacs, S. J. Gange and R. F. Siliciano (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.

Siliciano, J. D. and R. F. Siliciano (2005). "Enhanced culture assay for detection and quantitation of latently infected, resting CD4+ T-cells carrying replication-competent virus in HIV-1-infected individuals." *Methods Mol Biol* **304**: 3-15.

Simon, V., N. Bloch and N. R. Landau (2015). "Intrinsic host restrictions to HIV-1 and mechanisms of viral escape." *Nat Immunol* **16**(6): 546-553.

Simonetti, F. R., M. D. Sobolewski, E. Fyne, W. Shao, J. Spindler, J. Hattori, E. M. Anderson, S. A. Watters, S. Hill, X. Wu, D. Wells, L. Su, B. T. Luke, E. K. Halvas, G. Besson, K. J. Penrose, Z. Yang, R. W. Kwan, C. Van Waes, T. Uldrick, D. E. Citrin, J. Kovacs, M. A. Polis, C. A. Rehm, R. Gorelick, M. Piatak, B. F. Keele, M. F. Kearney, J. M. Coffin, S. H. Hughes, J. W. Mellors and F. Maldarelli (2016). "Clonally expanded CD4+ T cells can produce infectious HIV-1 in vivo." *Proc Natl Acad Sci U S A* **113**(7): 1883-1888.

Singh, S. P., H. H. Zhang, J. F. Foley, M. N. Hedrick and J. M. Farber (2008). "Human T cells that are able to produce IL-17 express the chemokine receptor CCR6." *J Immunol* **180**(1): 214-221.

Sloan, R. D. and M. A. Wainberg (2011). "The role of unintegrated DNA in HIV infection." *Retrovirology* **8**: 52.

Smith, D. M., S. Zarate, H. Shao, S. K. Pillai, S. L. Letendre, J. K. Wong, D. D. Richman, S. D. Frost, R. J. Ellis and H. Group (2009). "Pleocytosis is associated with disruption of HIV compartmentalization between blood and cerebral spinal fluid viral populations." *Virology* **385**(1): 204-208.

Smith, P. D., G. Meng, J. F. Salazar-Gonzalez and G. M. Shaw (2003). "Macrophage HIV-1 infection and the gastrointestinal tract reservoir." *J Leukoc Biol* **74**(5): 642-649.

Soghoian, D. Z., H. Jessen, M. Flanders, K. Sierra-Davidson, S. Cutler, T. Pertel, S. Ranasinghe, M. Lindqvist, I. Davis, K. Lane, J. Rychert, E. S. Rosenberg, A. Piechocka-Trocha, A. L. Brass, J. M. Brenchley, B. D. Walker and H. Streeck (2012). "HIV-specific cytolytic CD4 T cell responses during acute HIV infection predict disease outcome." *Sci Transl Med* **4**(123): 123ra125.

Sonza, S., A. Maerz, N. Deacon, J. Meanger, J. Mills and S. Crowe (1996). "Human immunodeficiency virus type 1 replication is blocked prior to reverse transcription and integration in freshly isolated peripheral blood monocytes." *J Virol* **70**(6): 3863-3869.

Soriano-Sarabia, N., R. E. Bateson, N. P. Dahl, A. M. Crooks, J. D. Kuruc, D. M. Margolis and N. M. Archin (2014). "Quantitation of replication-competent HIV-1 in populations of resting CD4+ T cells." *J Virol* **88**(24): 14070-14077.

Sousa, A. E., J. Carneiro, M. Meier-Schellersheim, Z. Grossman and R. M. Victorino (2002). "CD4 T cell depletion is linked directly to immune activation in the pathogenesis of HIV-1 and HIV-2 but only indirectly to the viral load." *J Immunol* **169**(6): 3400-3406.

Srivastava, S., S. K. Swanson, N. Manel, L. Florens, M. P. Washburn and J. Skowronski (2008). "Lentiviral Vpx accessory factor targets VprBP/DCAF1 substrate adaptor for cullin 4 E3 ubiquitin ligase to enable macrophage infection." *PLoS Pathog* **4**(5): e1000059.

St Gelais, C., S. de Silva, J. C. Hach, T. E. White, F. Diaz-Griffero, J. S. Yount and L. Wu (2014). "Identification of cellular proteins interacting with the retroviral restriction factor SAMHD1." *J Virol* **88**(10): 5834-5844.

Steinman, L. (2007). "A brief history of T(H)17, the first major revision in the T(H)1/T(H)2 hypothesis of T cell-mediated tissue damage." *Nat Med* **13**(2): 139-145.

Stopak, K., C. de Noronha, W. Yonemoto and W. C. Greene (2003). "HIV-1 Vif blocks the antiviral activity of APOBEC3G by impairing both its translation and intracellular stability." *Mol Cell* **12**(3): 591-601.

Strain, M. C., S. J. Little, E. S. Daar, D. V. Havlir, H. F. Gunthard, R. Y. Lam, O. A. Daly, J. Nguyen, C. C. Ignacio, C. A. Spina, D. D. Richman and J. K. Wong (2005). "Effect of treatment, during primary infection, on establishment and clearance of cellular reservoirs of HIV-1." *J Infect Dis* **191**(9): 1410-1418.

Stremlau, M., C. M. Owens, M. J. Perron, M. Kiessling, P. Autissier and J. Sodroski (2004). "The cytoplasmic body component TRIM5alpha restricts HIV-1 infection in Old World monkeys." *Nature* **427**(6977): 848-853.

Stremlau, M., M. Perron, M. Lee, Y. Li, B. Song, H. Javanbakht, F. Diaz-Griffero, D. J. Anderson, W. I. Sundquist and J. Sodroski (2006). "Specific recognition and accelerated uncoating of retroviral capsids by the TRIM5alpha restriction factor." *Proc Natl Acad Sci USA* **103**(14): 5514-5519.

Sun, H., D. Kim, X. Li, M. Kiselina, Z. Ouyang, L. Vandekerckhove, H. Shang, E. S. Rosenberg, X. G. Yu and M. Lichterfeld (2015). "Th1/17 Polarization of CD4 T Cells Supports HIV-1 Persistence during Antiretroviral Therapy." *J Virol* **89**(22): 11284-11293.

Sundquist, W. I. and H. G. Krausslich (2012). "HIV-1 assembly, budding, and maturation." *Cold Spring Harb Perspect Med* **2**(7): a006924.

Swiggard, W. J., C. Baytop, J. J. Yu, J. Dai, C. Li, R. Schretzenmair, T. Theodosopoulos and U. O'Doherty (2005). "Human immunodeficiency virus type 1 can establish latent infection in resting CD4+ T cells in the absence of activating stimuli." *J Virol* **79**(22): 14179-14188.

Swingler, S., A. M. Mann, J. Zhou, C. Swingler and M. Stevenson (2007). "Apoptotic killing of HIV-1-infected macrophages is subverted by the viral envelope glycoprotein." *PLoS Pathog* **3**(9): 1281-1290.

Tabler, C. O., M. B. Lucera, A. A. Haqqani, D. J. McDonald, S. A. Migueles, M. Connors and J. C. Tilton (2014). "CD4+ memory stem cells are infected by HIV-1 in a manner regulated in part by SAMHD1 expression." *J Virol* **88**(9): 4976-4986.

Tang, C., X. Ji, L. Wu and Y. Xiong (2015). "Impaired dNTPase activity of SAMHD1 by phosphomimetic mutation of Thr-592." *J Biol Chem* **290**(44): 26352-26359.

Tang, Q. and J. A. Bluestone (2013). "Regulatory T-cell therapy in transplantation: moving to the clinic." *Cold Spring Harb Perspect Med* **3**(11).

Taylor, S. and A. S. Pereira (2001). "Antiretroviral drug concentrations in semen of HIV-1 infected men." *Sex Transm Infect* **77**(1): 4-11.

Thompson, C. G., M. T. Bokhart, C. Sykes, L. Adamson, Y. Fedoriw, P. A. Luciw, D. C. Muddiman, A. D. Kashuba and E. P. Rosen (2015). "Mass spectrometry imaging reveals heterogeneous efavirenz distribution within putative HIV reservoirs." *Antimicrob Agents Chemother* **59**(5): 2944-2948.

Thompson, K. A., C. L. Cherry, J. E. Bell and C. A. McLean (2011). "Brain cell reservoirs of latent virus in presymptomatic HIV-infected individuals." *Am J Pathol* **179**(4): 1623-1629.

Thomson, M. M. and R. Najera (2005). "Molecular epidemiology of HIV-1 variants in the global AIDS pandemic: an update." *AIDS Rev* **7**(4): 210-224.

Tran, T. A., M. G. de Goer de Herve, H. Hendel-Chavez, B. Dembele, E. Le Nevet, K. Abbed, C. Pallier, C. Goujard, J. Gasnault, J. F. Delfraissy, A. M. Balazuc and Y. Taoufik (2008). "Resting regulatory CD4 T cells: a site of HIV persistence in patients on long-term effective antiretroviral therapy." *PLoS One* **3**(10): e3305.

Trautmann, L., L. Janbazian, N. Chomont, E. A. Said, S. Gimmig, B. Bessette, M. R. Boulassel, E. Delwart, H. Sepulveda, R. S. Balderas, J. P. Routy, E. K. Haddad and R. P. Sekaly (2006). "Upregulation of PD-1 expression on HIV-specific CD8+ T cells leads to reversible immune dysfunction." *Nat Med* **12**(10): 1198-1202.

Tschachler, E., V. Groh, M. Popovic, D. L. Mann, K. Konrad, B. Safai, L. Eron, F. diMarzo Veronese, K. Wolff and G. Stingl (1987). "Epidermal Langerhans cells--a target for HTLV-III/LAV infection." *J Invest Dermatol* **88**(2): 233-237.

Tungler, V., W. Staroske, B. Kind, M. Dobrick, S. Kretschmer, F. Schmidt, C. Krug, M. Lorenz, O. Chara, P. Schwille and M. A. Lee-Kirsch (2013). "Single-stranded nucleic acids promote SAMHD1 complex formation." *J Mol Med (Berl)* **91**(6): 759-770.

Twigg, H. L., D. M. Soliman, R. B. Day, K. S. Knox, R. J. Anderson, D. S. Wilkes and C. T. Schnitzlein-Bick (1999). "Lymphocytic alveolitis, bronchoalveolar lavage viral load, and outcome in human immunodeficiency virus infection." *Am J Respir Crit Care Med* **159**(5 Pt 1): 1439-1444.

Tyler, K. L. and J. C. McArthur (2002). "Through a glass, darkly: cerebrospinal fluid viral load measurements and the pathogenesis of human immunodeficiency virus infection of the central nervous system." *Arch Neurol* **59**(6): 909-912.

van Asten, L., F. Danisman, S. A. Otto, J. A. Borghans, M. D. Hazenberg, R. A. Coutinho, M. Prins and F. Miedema (2004). "Pre-seroconversion immune status predicts the rate of CD4 T cell decline following HIV infection." *AIDS* **18**(14): 1885-1893.

Van Damme, N., D. Goff, C. Katsura, R. L. Jorgenson, R. Mitchell, M. C. Johnson, E. B. Stephens and J. Guatelli (2008). "The interferon-induced protein BST-2 restricts HIV-1 release and is downregulated from the cell surface by the viral Vpu protein." *Cell Host Microbe* **3**(4): 245-252.

Van Heuverswyn, F., Y. Li, C. Neel, E. Bailes, B. F. Keele, W. Liu, S. Loul, C. Butel, F. Liegeois, Y. Bienvenue, E. M. Ngolle, P. M. Sharp, G. M. Shaw, E. Delaporte, B. H. Hahn and M. Peeters (2006). "Human immunodeficiency viruses: SIV infection in wild gorillas." *Nature* **444**(7116): 164.

VandeWoude, S. and C. Apetrei (2006). "Going wild: lessons from naturally occurring T-lymphotropic lentiviruses." *Clin Microbiol Rev* **19**(4): 728-762.

Vazquez, N., S. Rekka, M. Gliozzi, C. G. Feng, S. Amarnath, J. M. Orenstein and S. M. Wahl (2012). "Modulation of innate host factors by Mycobacterium avium complex in human macrophages includes interleukin 17." *J Infect Dis* **206**(8): 1206-1217.

Veazey, R. S., K. G. Mansfield, I. C. Tham, A. C. Carville, D. E. Shvetz, A. E. Forand and A. A. Lackner (2000). "Dynamics of CCR5 expression by CD4(+) T cells in lymphoid tissues during simian immunodeficiency virus infection." *J Virol* **74**(23): 11001-11007.

Vidal, N., C. Mulanga, S. E. Bazepo, F. Lepira, E. Delaporte and M. Peeters (2006). "Identification and molecular characterization of subtype A4 in central Africa." *AIDS Res Hum Retroviruses* **22**(2): 182-187.

Vieillard, V., J. L. Strominger and P. Debre (2005). "NK cytotoxicity against CD4+ T cells during HIV-1 infection: a gp41 peptide induces the expression of an NKp44 ligand." *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(31): 10981-10986.

Vinuesa, C. G., M. A. Linterman, D. Yu and I. C. MacLennan (2016). "Follicular Helper T Cells." *Annu Rev Immunol* **34**: 335-368.

von Stockenstrom, S., L. Odevall, E. Lee, E. Sinclair, P. Bacchetti, M. Killian, L. Epling, W. Shao, R. Hoh, T. Ho, N. R. Faria, P. Lemey, J. Albert, P. Hunt, L. Loeb, C. Pilcher, L. Poole, H. Hatano, M. Somsouk, D. Douek, E. Boritz, S. G. Deeks, F. M. Hecht and S. Palmer (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.

Wacleche, V. S., J. P. Goulet, A. Gosselin, P. Monteiro, H. Soudeyins, R. Fromentin, M. A. Jenabian, S. Vartanian, S. G. Deeks, N. Chomont, J. P. Routy and P. Ancuta (2016). "New insights into the heterogeneity of Th17 subsets contributing to HIV-1 persistence during antiretroviral therapy." *Retrovirology* **13**(1): 59.

Wacleche, V. S., A. Landay, J. P. Routy and P. Ancuta (2017). "The Th17 Lineage: From Barrier Surfaces Homeostasis to Autoimmunity, Cancer, and HIV-1 Pathogenesis." *Viruses* **9**(10).

Wagner, G. A., M. E. Pacold, S. L. Kosakovsky Pond, G. Caballero, A. Chaillon, A. E. Rudolph, S. R. Morris, S. J. Little, D. D. Richman and D. M. Smith (2014). "Incidence and prevalence of intrasubtype HIV-1 dual infection in at-risk men in the United States." *J Infect Dis* **209**(7): 1032-1038.

Wagner, T. A., S. McLaughlin, K. Garg, C. Y. Cheung, B. B. Larsen, S. Styrchak, H. C. Huang, P. T. Edlefsen, J. I. Mullins and L. M. Frenkel (2014). "HIV latency. Proliferation of cells with HIV integrated into cancer genes contributes to persistent infection." *Science* **345**(6196): 570-573.

Wain-Hobson, S., P. Sonigo, O. Danos, S. Cole and M. Alizon (1985). "Nucleotide sequence of the AIDS virus, LAV." *Cell* **40**(1): 9-17.

Walensky, R. P., A. D. Paltiel, E. Losina, L. M. Mercincavage, B. R. Schackman, P. E. Sax, M. C. Weinstein and K. A. Freedberg (2006). "The survival benefits of AIDS treatment in the United States." *J Infect Dis* **194**(1): 11-19.

Walker, B. D. and X. G. Yu (2013). "Unravelling the mechanisms of durable control of HIV-1." *Nat Rev Immunol* **13**(7): 487-498.

Wang, C., S. G. Kang, J. Lee, Z. Sun and C. H. Kim (2009). "The roles of CCR6 in migration of Th17 cells and regulation of effector T-cell balance in the gut." *Mucosal Immunol* **2**(2): 173-183.

Wang, Z., F. R. Simonetti, R. F. Siliciano and G. M. Laird (2018). "Measuring replication competent HIV-1: advances and challenges in defining the latent reservoir." *Retrovirology* **15**(1): 21.

Watson, S. J., M. R. Welkers, D. P. Depledge, E. Coulter, J. M. Breuer, M. D. de Jong and P. Kellam (2013). "Viral population analysis and minority-variant detection using short read next-generation sequencing." *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **368**(1614): 20120205.

Wei, W., H. Guo, X. Han, X. Liu, X. Zhou, W. Zhang and X. F. Yu (2012). "A novel DCAF1-binding motif required for Vpx-mediated degradation of nuclear SAMHD1 and Vpr-induced G2 arrest." *Cell Microbiol* **14**(11): 1745-1756.

Weiss, L., C. Piketty, L. Assoumou, C. Didier, L. Caccavelli, V. Donkova-Petrini, Y. Levy, P. M. Girard, M. Burgard, J. P. Viard, C. Rouzioux, D. Costagliola and A. S. s. group (2010). "Relationship between regulatory T cells and immune activation in human immunodeficiency virus-infected patients interrupting antiretroviral therapy." *PLoS One* **5**(7): e11659.

Welbourn, S., S. M. Dutta, O. J. Semmes and K. Strebel (2013). "Restriction of virus infection but not catalytic dNTPase activity is regulated by phosphorylation of SAMHD1." *J Virol* **87**(21): 11516-11524.

Wherry, E. J. (2011). "T cell exhaustion." *Nat Immunol* **12**(6): 492-499.

Wherry, E. J., S. J. Ha, S. M. Kaech, W. N. Haining, S. Sarkar, V. Kalia, S. Subramaniam, J. N. Blattman, D. L. Barber and R. Ahmed (2007). "Molecular signature of CD8+ T cell exhaustion during chronic viral infection." *Immunity* **27**(4): 670-684.

White, T. E., A. Brandariz-Nunez, J. C. Valle-Casuso, S. Amie, L. Nguyen, B. Kim, J. Brojatsch and F. Diaz-Griffero (2013). "Contribution of SAM and HD domains to retroviral restriction mediated by human SAMHD1." *Virology* **436**(1): 81-90.

White, T. E., A. Brandariz-Nunez, J. C. Valle-Casuso, S. Amie, L. A. Nguyen, B. Kim, M. Tuzova and F. Diaz-Griffero (2013). "The retroviral restriction ability of SAMHD1, but not its deoxynucleotide triphosphohydrolase activity, is regulated by phosphorylation." *Cell Host Microbe* **13**(4): 441-451.

Whitney, J. B., A. L. Hill, S. Sanisetty, P. Penaloza-MacMaster, J. Liu, M. Shetty, L. Parenteau, C. Cabral, J. Shields, S. Blackmore, J. Y. Smith, A. L. Brinkman, L. E. Peter, S. I. Mathew, K. M. Smith, E. N. Borducchi, D. I. Rosenbloom, M. G. Lewis, J. Hattersley, B. Li, J. Hesselgesser, R. Geleziunas, M. L. Robb, J. H. Kim, N. L. Michael and D. H. Barouch (2014). "Rapid seeding of the viral reservoir prior to SIV viraemia in rhesus monkeys." *Nature* **512**(7512): 74-77.

Wiegand, A., J. Spindler, F. F. Hong, W. Shao, J. C. Cyktor, A. R. Cillo, E. K. Halvas, J. M. Coffin, J. W. Mellors and M. F. Kearney (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.

Wightman, F., A. Solomon, G. Khoury, J. A. Green, L. Gray, P. R. Gorry, Y. S. Ho, N. K. Saksena, J. Hoy, S. M. Crowe, P. U. Cameron and S. R. Lewin (2010). "Both CD31(+) and CD31(-) naive CD4(+) T cells are persistent HIV type 1-infected reservoirs in individuals receiving antiretroviral therapy." *J Infect Dis* **202**(11): 1738-1748.

Wilén, C. B., J. C. Tilton and R. W. Doms (2012). "HIV: cell binding and entry." *Cold Spring Harb Perspect Med* **2**(8).

Williams, J. P., J. Hurst, W. Stohr, N. Robinson, H. Brown, M. Fisher, S. Kinloch, D. Cooper, M. Schechter, G. Tambussi, S. Fidler, M. Carrington, A. Babiker, J. Weber, K. K. Koelsch, A. D. Kelleher, R. E. Phillips, J. Frater and S. P. Investigators (2014). "HIV-1 DNA predicts disease progression and post-treatment virological control." *Elife* **3**: e03821.

Williams, K. C., S. Corey, S. V. Westmoreland, D. Pauley, H. Knight, C. deBakker, X. Alvarez and A. A. Lackner (2001). "Perivascular macrophages are the primary cell type productively infected by simian immunodeficiency virus in the brains of macaques: implications for the neuropathogenesis of AIDS." *J Exp Med* **193**(8): 905-915.

Wilson, J. D., G. S. Ogg, R. L. Allen, C. Davis, S. Shaunak, J. Downie, W. Dyer, C. Workman, S. Sullivan, A. J. McMichael and S. L. Rowland-Jones (2000). "Direct visualization of HIV-1-specific cytotoxic T lymphocytes during primary infection." *AIDS* **14**(3): 225-233.

Winston, J. A., L. A. Bruggeman, M. D. Ross, J. Jacobson, L. Ross, V. D. D'Agati, P. E. Klotman and M. E. Klotman (2001). "Nephropathy and establishment of a renal reservoir of HIV type 1 during primary infection." *N Engl J Med* **344**(26): 1979-1984.

Wong, J. K., M. Hezareh, H. F. Gunthard, D. V. Havlir, C. C. Ignacio, C. A. Spina and D. D. Richman (1997). "Recovery of replication-competent HIV despite prolonged suppression of plasma viremia." *Science* **278**(5341): 1291-1295.

Woodland, D. L. and J. E. Kohlmeier (2009). "Migration, maintenance and recall of memory T cells in peripheral tissues." *Nat Rev Immunol* **9**(3): 153-161.

Xin, B., S. Jones, E. G. Puffenberger, C. Hinze, A. Bright, H. Tan, A. Zhou, G. Wu, J. Vargus-Adams, D. Agamanolis and H. Wang (2011). "Homozygous mutation in SAMHD1 gene causes cerebral vasculopathy and early onset stroke." *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**(13): 5372-5377.

Xu, H., X. Wang, N. Malam, A. A. Lackner and R. S. Veazey (2015). "Persistent Simian Immunodeficiency Virus Infection Causes Ultimate Depletion of Follicular Th Cells in AIDS." *J Immunol* **195**(9): 4351-4357.

Xu, Y., C. Weatherall, M. Bailey, S. Alcantara, R. De Rose, J. Estaquier, K. Wilson, K. Suzuki, J. Corbeil, D. A. Cooper, S. J. Kent, A. D. Kelleher and J. Zaunders (2013). "Simian immunodeficiency virus infects follicular helper CD4 T cells in lymphoid tissues during pathogenic infection of pigtail macaques." *J Virol* **87**(7): 3760-3773.

Yan, J., C. Hao, M. DeLucia, S. Swanson, L. Florens, M. P. Washburn, J. Ahn and J. Skowronski (2015). "CyclinA2-Cyclin-dependent Kinase Regulates SAMHD1 Protein Phosphohydrolase Domain." *J Biol Chem* **290**(21): 13279-13292.

Yan, J., S. Kaur, M. DeLucia, C. Hao, J. Mehrens, C. Wang, M. Golczak, K. Palczewski, A. M. Gronenborn, J. Ahn and J. Skowronski (2013). "Tetramerization of SAMHD1 is required for biological activity and inhibition of HIV infection." *J Biol Chem* **288**(15): 10406-10417.

Ye, P., P. B. Garvey, P. Zhang, S. Nelson, G. Bagby, W. R. Summer, P. Schwarzenberger, J. E. Shellito and J. K. Kolls (2001). "Interleukin-17 and lung host defense against *Klebsiella pneumoniae* infection." *Am J Respir Cell Mol Biol* **25**(3): 335-340.

Yukl, S. A., S. Gianella, E. Sinclair, L. Epling, Q. Li, L. Duan, A. L. Choi, V. Girling, T. Ho, P. Li, K. Fujimoto, H. Lampiris, C. B. Hare, M. Pandori, A. T. Haase, H. F. Gunthard, M. Fischer, A. K. Shergill, K. McQuaid, D. V. Havlir and J. K. Wong (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.

Yukl, S. A., A. K. Shergill, T. Ho, M. Killian, V. Girling, L. Epling, P. Li, L. K. Wong, P. Crouch, S. G. Deeks, D. V. Havlir, K. McQuaid, E. Sinclair and J. K. Wong (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**(8): 1212-1220.

Yukl, S. A., A. K. Shergill, K. McQuaid, S. Gianella, H. Lampiris, C. B. Hare, M. Pandori, E. Sinclair, H. F. Gunthard, M. Fischer, J. K. Wong and D. V. Havlir (2010). "Effect of raltegravir-containing intensification on HIV burden and T-cell activation in multiple gut sites of HIV-positive adults on suppressive antiretroviral therapy." *AIDS* **24**(16): 2451-2460.

Zajac, A. J., J. N. Blattman, K. Murali-Krishna, D. J. Sourdive, M. Suresh, J. D. Altman and R. Ahmed (1998). "Viral immune evasion due to persistence of activated T cells without effector function." *J Exp Med* **188**(12): 2205-2213.

Zarate, S., S. L. Pond, P. Shapshak and S. D. Frost (2007). "Comparative study of methods for detecting sequence compartmentalization in human immunodeficiency virus type 1." *J Virol* **81**(12): 6643-6651.

Zeng, M., A. T. Haase and T. W. Schacker (2012). "Lymphoid tissue structure and HIV-1 infection: life or death for T cells." *Trends Immunol* **33**(6): 306-314.

Zeng, M., A. J. Smith, S. W. Wietgreffe, P. J. Southern, T. W. Schacker, C. S. Reilly, J. D. Estes, G. F. Burton, G. Silvestri, J. D. Lifson, J. V. Carlis and A. T. Haase (2011). "Cumulative mechanisms of lymphoid tissue fibrosis and T cell depletion in HIV-1 and SIV infections." *J Clin Invest* **121**(3): 998-1008.

Zeng, M., P. J. Southern, C. S. Reilly, G. J. Beilman, J. G. Chipman, T. W. Schacker and A. T. Haase (2012). "Lymphoid tissue damage in HIV-1 infection depletes naive T cells and limits T cell reconstitution after antiretroviral therapy." *PLoS Pathog* **8**(1): e1002437.

Zhang, H., B. Yang, R. J. Pomerantz, C. Zhang, S. C. Arunachalam and L. Gao (2003). "The cytidine deaminase CEM15 induces hypermutation in newly synthesized HIV-1 DNA." *Nature* **424**(6944): 94-98.

Zhang, J. and A. S. Perelson (2013). "Contribution of follicular dendritic cells to persistent HIV viremia." *J Virol* **87**(14): 7893-7901.

Zhang, L., C. Chung, B. S. Hu, T. He, Y. Guo, A. J. Kim, E. Skulsky, X. Jin, A. Hurley, B. Ramratnam, M. Markowitz and D. D. Ho (2000). "Genetic characterization of rebounding HIV-1 after cessation of highly active antiretroviral therapy." *J Clin Invest* **106**(7): 839-845.

Zhang, L., L. Rowe, T. He, C. Chung, J. Yu, W. Yu, A. Talal, M. Markowitz and D. D. Ho (2002). "Compartmentalization of surface envelope glycoprotein of human immunodeficiency virus type 1 during acute and chronic infection." *J Virol* **76**(18): 9465-9473.

Zheng, Y. H., D. Irwin, T. Kurosu, K. Tokunaga, T. Sata and B. M. Peterlin (2004). "Human APOBEC3F is another host factor that blocks human immunodeficiency virus type 1 replication." *J Virol* **78**(11): 6073-6076.

Zhou, S., C. Jones, P. Mieczkowski and R. Swanstrom (2015). "Primer ID Validates Template Sampling Depth and Greatly Reduces the Error Rate of Next-Generation Sequencing of HIV-1 Genomic RNA Populations." *J Virol* **89**(16): 8540-8555.

Zhu, C., W. Gao, K. Zhao, X. Qin, Y. Zhang, X. Peng, L. Zhang, Y. Dong, W. Zhang, P. Li, W. Wei, Y. Gong and X. F. Yu (2013). "Structural insight into dGTP-dependent activation of tetrameric SAMHD1 deoxynucleoside triphosphate triphosphohydrolase." *Nat Commun* **4**: 2722.

Zhu, P., J. Liu, J. Bess, Jr., E. Chertova, J. D. Lifson, H. Grise, G. A. Ofek, K. A. Taylor and K. H. Roux (2006). "Distribution and three-dimensional structure of AIDS virus envelope spikes." *Nature* **441**(7095): 847-852.

Zhu, T., N. Wang, A. Carr, D. S. Nam, R. Moor-Jankowski, D. A. Cooper and D. D. Ho (1996). "Genetic characterization of human immunodeficiency virus type 1 in blood and genital

secretions: evidence for viral compartmentalization and selection during sexual transmission." J Virol **70**(5): 3098-3107.

Zielinski, C. E., F. Mele, D. Aschenbrenner, D. Jarrossay, F. Ronchi, M. Gattorno, S. Monticelli, A. Lanzavecchia and F. Sallusto (2012). "Pathogen-induced human TH17 cells produce IFN-gamma or IL-10 and are regulated by IL-1beta." Nature **484**(7395): 514-518.

Abstract

c-ART is effective but cannot fully eradicate HIV-1. Indeed, treatment interruption leads to rebound in viremia as the virus persists in cellular reservoirs. The remarkable stability of the latent HIV-1 reservoir in the CD4⁺ memory T cell population prevents viral eradication. It has been suggested that the pool of latently infected cells is not static and HIV-1 reservoir can persist through cell proliferation, but also through provirus integration into cellular genes associated with cell survival and/or proliferation. Restriction factors such as SAMHD1, a dNTP triphosphohydrolase, limits productive HIV-1 infection in dendritic cells, myeloid cells and resting CD4⁺ T cells. The role of SAMHD1 in various CD4⁺ T-cell subsets from healthy and HIV-1 infected individuals, have not been extensively characterized.

Recently, we reported that circulating memory CD4⁺ T cells comprise a population of cells expressing low levels of SAMHD1 (CD4⁺ CD45RO⁺ SAMHD1^{low}). Those memory SAMHD1^{low} CD4⁺ T cells were highly differentiated and activated, exhibited a large proportion of cycling cells, and were enriched in Th17 in peripheral blood. We also demonstrated that SAMHD1^{low} cells were more susceptible to HIV-1 infection and thus preferentially depleted in HIV-1 infected individuals. In secondary lymphoid organs, Tfh cells from infected patients lacked the expression of SAMHD1, which was accompanied by a higher susceptibility to HIV-1 infection *in vitro*.

We hypothesized that SAMHD1^{low} cells represent a preferential target for HIV-1 and might have a role in the establishment and persistence of HIV-1 reservoir, thus, opening up prospects for exploring the pathways leading to the persistence of the virus in cells.

The first objective of my study was to further characterize the highly proliferative memory SAMHD1^{low} CD4⁺ T cells by flow cytometry. We demonstrated that these cells were enriched in activated memory cells including Th17 and CCR6⁺DN cells, two major populations that are susceptible to HIV-1 infection, and were significantly decreased during HIV-1 infection in gastrointestinal tract and peripheral blood.

The second objective of my study was to investigate whether memory SAMHD1^{low} cells that hold high proliferative capacity, contain increased levels of HIV-1 DNA with distinct HIV-1 populations, viral compartmentalization and migration events between CD4⁺ T cell subsets. We demonstrate that memory SAMHD1^{low} cells from c-ART patients carry high levels of HIV-1 DNA compared to SAMHD1⁺ cells, and these levels positively and significantly correlated with Ki67 expression. Phylogenetic analyses revealed well-segregated HIV-1 DNA populations with significant compartmentalization between SAMHD1^{low} and SAMHD1⁺ cells and limited viral exchange. Altogether these data demonstrate that memory SAMHD1^{low} cells contribute to HIV-1 persistence and support the concept of proliferation as a mechanism of viral persistence in memory CD4⁺ T cells in peripheral blood.

The third objective of my study was to further characterize SAMHD1^{low} memory cells in peripheral blood to identify extracellular markers. We performed Next Generation Sequencing to identify genes that characterize SAMHD1^{low} memory cells and the collected data revealed a list of extracellular markers that will allow their isolation for functional studies. All together, these data will reveal novel pathways that will help decipher HIV-1 pathogenesis and establishment of cellular reservoirs.

Key words: HIV-1, SAMHD1, memory CD4⁺ T cell, reservoir, Th17, Ki67

Résumé

Bien que les thérapies antirétrovirales c-ART soient très efficaces pour réduire la morbidité et la mortalité liées au VIH-1, ce traitement ne parvient pas à l'éradication complète du virus de l'organisme. En effet, le traitement inhibe considérablement la réplication du VIH-1 et permet de réduire la charge virale plasmatique à des niveaux indétectables, mais dès lors que celui-ci est interrompu, un rebond viral rapide est observé chez de nombreux individus. Ce rebond de charge virale est la preuve incontestable de la persistance du virus et de la mise en place d'un réservoir pour le VIH-1 malgré les traitements. Les cellules T CD4⁺ mémoires ont été décrites comme la principale cible du VIH-1 et sont massivement déplétées au cours d'une infection aiguë. Des études ont révélé un lien entre la persistance de cellules infectées de manière latente et l'intégration provirale dans des gènes liés à la prolifération cellulaire. La mise en évidence du rôle de la molécule SAMHD1 dans l'infection par le VIH-1 en tant que facteur de restriction a ouvert de nouvelles perspectives dans la compréhension de la pathogénicité du virus. Néanmoins, le rôle de SAMHD1 dans les différentes sous-populations de cellules T CD4⁺ n'a pas été étudié de manière détaillée.

Précédemment, nous avons révélé l'existence d'une sous-population de lymphocytes T CD4⁺ mémoires exprimant de faibles niveaux de SAMHD1 (CD4⁺ CD45RO⁺ SAMHD1^{low}). Ces cellules SAMHD1^{low} sont hautement prolifératives et se retrouvent préférentiellement dans le compartiment mémoire, avec un phénotype très activé et différencié et sont significativement diminuées chez les patients infectés par le VIH-1 par rapport aux sujets sains. Nous avons montré que dans le sang périphérique, ces cellules sont enrichies en cellules Th17 alors que dans les ganglions elles ont un phénotype de Tfh, deux sous-populations cellulaires décrites comme les sites principaux de réplication du virus.

Nous avons émis l'hypothèse que les cellules SAMHD1^{low} représentent une cible préférentielle du VIH-1 et pourraient jouer un rôle dans l'établissement et la persistance du réservoir, ouvrant ainsi des perspectives pour explorer les voies conduisant à la persistance du virus dans les cellules. Le premier objectif de mon projet de thèse consistait à étudier le phénotype des cellules mémoires SAMHD1^{low} à forte capacité de prolifération. Par des expériences de cytométrie en flux, nous avons montré que les cellules SAMHD1^{low} avaient un phénotype effecteur et « mémoire activé », qu'elles n'étaient pas sénescents, qu'elles étaient enrichies en cellules Th17 et CCR6⁺DN dans le sang périphérique et qu'elles étaient significativement diminuées dans le sang périphérique et le tractus gastro-intestinal de patients infectés par le VIH-1.

Le second objectif de mon projet de thèse consistait à déterminer si ces cellules contenaient des niveaux élevés d'ADN viral avec des populations distinctes de VIH-1 et une compartimentation de celles-ci. Par des expériences de quantification d'ADN viral et de séquençage à haut débit, nous avons révélé que les cellules mémoires SAMHD1^{low} contenaient des niveaux d'ADN VIH-1 total plus élevés par rapport aux cellules mémoires SAMHD1⁺, que les séquences étaient compartimentées, et que ces niveaux corrélaient positivement avec les niveaux d'expression de Ki67 dans ces cellules, appuyant le concept de prolifération en tant que mécanisme de persistance virale dans les lymphocytes T CD4⁺ mémoires dans le sang périphérique.

Le troisième objectif de mon projet de thèse consistait à caractériser d'avantage les cellules SAMHD1^{low} par l'analyse des profils transcriptionnels (NGS) dans le but de mettre en évidence des marqueurs membranaires qui aideront à leur isolation pour des études fonctionnelles. Nous avons révélé une liste de gènes candidats dont l'expression protéique est membranaire.

Ce travail a permis d'élucider d'une part les mécanismes qui conduisent à la déplétion des lymphocytes mémoires CD4⁺ au cours de l'infection par le VIH et d'autre part d'explorer les voies conduisant à la persistance du virus dans les cellules.

Mots clés : VIH-1, SAMHD1, cellules T CD4⁺ mémoires, réservoir, Th17, Ki67